

ENSAIO DO COMETA PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS DO RIO PARAÍBA DO SUL, NUMA ÁREA SOB INFLUÊNCIA DE UMA REFINARIA DE PETRÓLEO

Tatiana da Silva Souza¹ (Universidade Estadual Paulista), Carmem Silvia Fontanetti² (Universidade Estadual Paulista)

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Campus de Rio Claro, tssouza@rc.unesp.br

² Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Campus de Rio Claro, fontanet@rc.unesp.br

O meio aquático geralmente é afetado pelo despejo diário de efluentes oriundos de diversas indústrias, inclusive a petrolífera. Dessa forma, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos para um diagnóstico atualizado dos recursos hídricos, aplicando metodologias que permitam o estabelecimento de planos de ações e de investimentos para atender às metas de qualidade. Atualmente, testes biológicos têm sido utilizados como indicadores de poluição ambiental. O presente trabalho apresenta os resultados da avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de refinaria de petróleo (São José dos Campos – SP), por meio do ensaio do cometa, o qual detecta possíveis lesões no DNA (genotoxicidade) de organismos expostos a poluentes. Essas lesões podem, a longo prazo, constituir mutagenicidade, carcinogenicidade ou letalidade. O ensaio do cometa foi aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), expostos em laboratório às amostras de água oriundas do rio. Essas amostras foram coletadas em três pontos: montante do despejo do efluente (P1), no local do despejo (P2) e a jusante do mesmo (P3). Água de poço artesiano foi utilizada como controle. As coletas ocorreram nos meses de maio e agosto de 2004 (estação seca) e em novembro de 2004 e janeiro de 2005 (estação chuvosa). A análise estatística aplicada (ANOVA - teste de variância com o teste de Dunnett) indicou a presença de substâncias genotóxicas presentes no rio nos pontos P2 e P3, em todos os meses de coleta. Portanto, não houve qualquer influência sazonal. Diante do exposto, concluímos que as águas do rio Paraíba do Sul apresentaram-se comprometidas na área influenciada pela refinaria de petróleo. O ensaio do cometa poderia ser rotineiramente requerido pelos órgãos governamentais para detecção de agentes potencialmente poluidores, que são lançados no meio aquático. Espera-se que este trabalho, utilizando bioindicadores da qualidade ambiental, possa subsidiar ações institucionais, na definição de medidas saneadoras para o restabelecimento das condições de desenvolvimento sustentável, visando a qualidade de vida da população e da biota aquática.

Palavras-chave: Biomonitoramento, Rio Paraíba do Sul, refinaria de petróleo, genotoxicidade, Oreochromis niloticus

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista ambiental, as refinarias de petróleo apresentam potencial elevado para degradar o meio ambiente em todos os seus níveis (Mariano, 2001).

O meio aquático geralmente é afetado pelo despejo diário de efluente oriundo da indústria petrolífera. Este é o caso do rio Paraíba do Sul, que recebe tal efluente em São José dos Campos - SP, importante cidade do Vale do Paraíba. O efluente de refinaria, que contém substâncias comprovadamente tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, quando não tratado de maneira adequada, pode levar a poluição dos corpos d'água e afetar negativamente a biota associada a esse ecossistema, bem como gerar problemas para a saúde e bem estar da população que vive em torno de águas poluídas.

Desse modo, a avaliação da qualidade das águas receptoras de efluentes de refinarias de petróleo faz-se necessária. Uma das ferramentas para a realização de tal avaliação é o desenvolvimento de testes biológicos, em que lesões no material genético dos seres vivos expostos às amostras do recurso hídrico de interesse são utilizadas como parâmetro de genotoxicidade. Segundo Lee *et al.* (1999) lesões no DNA de organismos que habitam ecossistemas aquáticos têm sido associadas com redução no crescimento, desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos. Além disso, sabe-se que agentes genotóxicos constituem agentes pré-mutagênicos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível potencial genotóxico das águas do rio Paraíba do Sul, numa área onde ocorre o despejo de efluente de refinaria de petróleo, utilizando *Oreochromis niloticus* como espécie bioindicadora. A análise foi realizada por meio do ensaio do cometa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biomonitoramento do meio aquático por meio do ensaio do cometa

A proteção dos ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência antrópica sobre os sistemas biológicos (Cairns *et al.*, 1993). Neste contexto, a definição de biomonitoramento mais aceita é o uso sistemático das respostas de organismos vivos, seja ele como um todo ou, através de um determinado tecido, para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações humanas (Matthews *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 2003). Os programas de biomonitoramento são, em geral, utilizados na detecção do problema e posterior controle do mesmo.

Segundo Metcalfe (1989), a utilização de respostas biológicas como indicadoras de degradação ambiental é vantajoso em relação às medidas físicas e químicas da água, pois estas registram apenas o momento em que foram coletadas, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente. Outra desvantagem é que, se forem realizadas longe da fonte poluente, as medições químicas podem não serem capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema (Pratt e Coler, 1976).

Crítérios biológicos são, conforme Karr (1981), valiosos na investigação de alterações dos recursos hídricos porque medem diretamente a condição de risco do recurso, detectam problemas que outros métodos podem subestimar ou não diagnosticar e fornecem um processo sistemático para a avaliação progressiva resultante da implementação de programas de qualidade de água. Segundo o autor, os critérios biológicos não substituem métodos químicos e físicos, mas aumentam a probabilidade de um programa de avaliação detectar degradação devido influências antropogênicas.

Neste contexto, diversos testes citogenéticos de curta duração têm sido utilizados para a avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de rios que recebem algum tipo de descarga possivelmente poluidora.

Segundo Pilot e Dragan (1996) e Mídio e Martins (2000), agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico.

Nas duas últimas décadas, novas metodologias para avaliação de danos no DNA têm sido desenvolvidas. Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade tem sido o ensaio do cometa devido sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas (Kammann *et al.*, 2001).

Durante a última década, o ensaio do cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (Gontijo e Tice, 2003).

Dentre as inúmeras aplicações do ensaio do cometa, a eficiência da técnica para a detecção do potencial genotóxico de contaminantes aquáticos tem sido descrita por muitos autores (Kosz-Vnenchak e Rorosz, 1997; Sasaki *et al.*, 1997; Avishai *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2004). O potencial de aplicação do ensaio do cometa para biomonitoramento ambiental é quase ilimitado, com vários organismos aquáticos sendo utilizados para este fim (Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 1995; Haumoutene *et al.*, 2002; Klobucar *et al.*, 2003).

O ensaio do cometa tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes, sendo destacada a sensibilidade das células sangüíneas destes animais aos efeitos genotóxicos (Mitchelmore e Chipman, 1998; Nacci *et al.*, 1996; Belpaeme *et al.*, 1996). Em peixes, a técnica também tem sido aplicada em outros tipos celulares, tais como hepatócitos, células da brânquia, células renais e células intestinais (Nacci *et al.*, 1996; Belpaeme *et al.*, 1998; Abd-Allah *et al.*, 1999).

Esta técnica tem sido uma ferramenta bastante útil na avaliação do potencial genotóxico de áreas impactadas com petróleo e seus derivados. Hamoutene *et al.* (2002) e Taban *et al.* (2004) aplicaram a técnica em invertebrados, expostos a águas contaminadas com uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Os resultados obtidos demonstraram que baixos níveis de hidrocarbonetos foram capazes de gerar lesões no DNA dos organismos testados.

5.4. Peixes como organismos-teste e considerações sobre *Oreochromis niloticus*

Nos ecossistemas marinhos e de água doce, uma grande variedade de organismos, tais como peixes (Hayashi *et al.*, 1998) e anfíbios (Békaert *et al.*, 1999), tem sido largamente empregados como bioindicadores para monitorar áreas com diferentes níveis de poluição.

Dentre os organismos utilizados como bioindicadores, os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de Biomonitoramento Aquático, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental (Powers, 1989).

De acordo com Harshbarger e Clark (1990), os peixes são expostos a substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados, podendo ser utilizados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos.

Além disso, peixes desempenham diferentes papéis na cadeia trófica, sendo capazes de bioacumular, de forma direta, contaminantes dissolvidos na água. Acumulam também contaminantes de forma indireta, quando estes são incorporados por ingestão de outros organismos contaminados, viventes no mesmo ambiente (Minissi *et al.*, 1996).

Os alimentos constituem a principal rota para exposição humana a substâncias tóxicas e peixes têm sido reconhecidos como os principais vetores de tais substâncias para humanos (Al-Sabit e Metcalfe, 1994).

De acordo com Kligerman (1982), Tsoi (1970, 1974) e Tsoi *et al.* (1975) foram os primeiros pesquisadores a investigarem os efeitos de agentes químicos mutagênicos no material genético de peixes e Longwell (1976) realizou um trabalho pioneiro analisando danos cromossômicos em peixes coletados em ambientes poluídos.

Segundo Sanchez-Galan *et al.* (1998), teoricamente, uma espécie de peixe ideal para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade é aquela que apresenta os seguintes critérios: (1) é largamente distribuída em vários ecossistemas; (2) sensível o bastante para detectar poluentes, mesmo em baixas concentrações; (3) é adequada para trabalhos em laboratório; (4) em populações naturais permite a captura de indivíduos sem detrimento para a conservação da espécie.

O gênero *Oreochromis* tem sido largamente utilizado na Genética Toxicológica e nos estudos de Biomonitoramento Ambiental (Grisolia e Starling, 2001; Çavas e Ergene-Gözükar, 2003; Souza e Fontanetti, 2006). De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) constitui excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais, sendo frequentemente utilizada para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos. De acordo com Vijayan *et al.* (1996), *O. niloticus* é reconhecida pela sua sensibilidade em responder, rapidamente, às alterações ambientais.

A espécie *O. niloticus* é um peixe de água doce, onívoro (Starling, 1998), de origem africana, que foi introduzida no Brasil pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (D.N.O.C. S.), em 1971, em alguns açudes do Nordeste. Em 1982, esta espécie foi introduzida na região Sudeste do país (Tanaka, 2001). Atualmente, *O. niloticus* é comercialmente importante no Brasil, particularmente no estado de São Paulo, constituindo importante fonte de proteína (Tavares-Dias e Moraes, 2003). Esta espécie é também comumente encontrada em estuários de todo o mundo, inclusive rio Paraíba do Sul (Hilsdorf e Petrere Jr, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

O organismo teste utilizado neste trabalho foi *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichilidae), popularmente conhecido como tilápia do Nilo. No total foram utilizados 80 indivíduos com tamanho médio de 15cm. Os espécimens, oriundos de piscicultura (UNESP - Campus de São José do Rio Preto), foram trazidos ao Laboratório de Toxicidade de Águas da UNESP de Rio Claro, onde foram aclimatados por uma semana em tanque, a temperatura média de 23°C, com sistema de filtragem e aeração.

3.2. Área de estudo e coleta das amostras de água

Amostras de água foram coletadas ao longo do rio Paraíba do Sul, município de São José dos Campos, numa área influenciada por uma refinaria de petróleo. As coletas foram realizadas nos meses de maio, agosto e novembro de 2004 e em janeiro de 2005. Três pontos de coleta foram estabelecidos: Ponto 1 (P1) - montante do despejo (localização: 23K0410312, UTM7441024); Ponto 2 (P2) - despejo da refinaria de petróleo (localização: 23K0314313, UTM7441303) e Ponto 3 (P3) - jusante do despejo (localização: 23K0413995, UTM7441523). As

amostras de água coletadas foram transportadas em frasco âmbar, no gelo, até o Departamento de Bioquímica da UNESP de Rio Claro, onde permaneceram à 4°C até o início do experimento.

3.3. Dados climatológicos

Dados climatológicos da Estação Meteorológica de Superfície de São José dos Campos referentes aos meses de coleta de amostras de água do rio Paraíba do Sul, foram obtidos junto ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao Voo de São Paulo.

De acordo com esses dados os meses de maio e agosto de 2004 apresentaram menor índice pluviométrico, quando comparados com novembro de 2004 e janeiro de 2005. Desse modo, maio e agosto constituiu a estação seca, enquanto novembro e janeiro a estação chuvosa.

Tabela 1. Dados climatológicos da cidade de São José dos Campos – SP referentes aos períodos de coleta das amostras de água do rio Paraíba do Sul

Período de coleta	Temperaturamáxima	Temperaturaminima	URA (%)	PT (mm)	NTDC
Estação seca	22.42 °C	15.11 °C	51.35	2.70	12
Estação chuvosa	25.50 °C	22.50 °C	78.50	93.0	33

Nota: Os valores acima foram obtidos a partir das médias de medidas diárias.

Estação seca: Maio e Agosto de 2004

Estação chuvosa: Novembro de 2004 e Janeiro de 2005

URA: Umidade relativa do ar

PT: Precipitação total

NTDC: Número total de dias chuvosos

3.4. Montagem do bioensaio e ensaio do cometa

Para o bioensaio foram utilizados 4 aquários. Em um deles foi realizado o teste controle com água de poço artesiano. Nos 3 aquários restantes foram colocadas as amostras de água oriundas das coletas realizadas. Cada aquário recebeu 12 L de água, que permaneceu aerando por 48 horas. Após esse período, 5 peixes foram colocados aleatoriamente em cada aquário, onde permaneceram por 72 horas, para serem assim estimados os efeitos dos possíveis contaminantes das águas do rio Paraíba do Sul. Durante o experimento os animais não foram alimentados.

A metodologia utilizada para o ensaio do cometa foi a descrita por Singh *et al.* (1988), após algumas modificações. Primeiramente, lâminas foram mergulhadas em agarose normal (ponto de fusão normal) 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca com seringas heparinizadas. Uma amostra de 5 µl do sangue dos peixes foi diluída em 1.000 µl de soro bovino fetal. As lâminas foram montadas com 10 µl da suspensão celular + 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37° C. As lâminas foram mantidas em solução de lise (1ml de triton X-100, 10 ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauril sarcosinato sódico para 1 Litro), em geladeira, por no mínimo 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13) à 4°C, em corrente de 25V, 300mA. As lâminas permaneceram 20 minutos na cuba antes da corrida de eletroforese e foram, a seguir, neutralizadas com tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas a temperatura ambiente e fixadas em etanol 100% por 10 minutos. A coloração foi feita com brometo de etídio (0.02 mg/ml).

Foram analisadas visualmente 100 células por indivíduo, totalizando 500 células por tratamento. Os cometas foram classificados em categorias de migração, pelo grau de dano no DNA, segundo Kobayashi *et al.* (1995); foi calculado então o escore de dano como a soma do número de células em cada classe e o total de cada classe multiplicado pelo valor da mesma (0-3); portanto, os escores podem variar de 0 (todas as células sem dano – 0x100) a 300 (todas as células com dano máximo – 3x100).

3.5.1 Análise estatística

O teste estatístico ANOVA - teste de variância com o teste de Dunnett foi aplicado para a comparação dos escores de cada ponto de coleta com o controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em todos os meses de coleta, os valores médios de escore de dano no DNA encontrados no ponto 1 foram estatisticamente iguais ao tratamento controle. Nesses tratamentos houve a predominância de cometas pertencentes à classe 0 (Figura 1), caracterizando danos mínimos ao DNA dos peixes expostos. Em contraste, os pontos 2 e 3 apresentaram valores médios de escores significativos, quando comparados ao controle. Nesses dois pontos, a maioria dos cometas observados pertencem à classe 2 (Figura 1).

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, expostos às águas do rio Paraíba do Sul estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Genotoxicidade das águas do rio Paraíba do Sul, por meio do ensaio do cometa aplicado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*.

Período de coleta	Ponto de coleta	TNA	Escore
Estação seca	Controle	1000	26.90±18.02
	Ponto 1	1000	65.80±43.98
	Ponto2	1000	217.2±32.40*
	Ponto3	1000	216.5±34.70*
Estação chuvosa	Controle	1000	54.60±40.52
	Ponto1	1000	55.60±24.04
	Ponto2	1000	201.0±30.45*
	Ponto3	1000	199.4±37.90*

* $p < 0.05$

Estação seca: Maio e Agosto de 2004

Estação chuvosa: Novembro de 2004 e Janeiro de 2005

Pontos de coleta: Ponto1: montante do despejo da refinaria de petróleo; Ponto 2: local do despejo; Ponto 3: jusante do despejo

TNA: total de nucleóides analisados

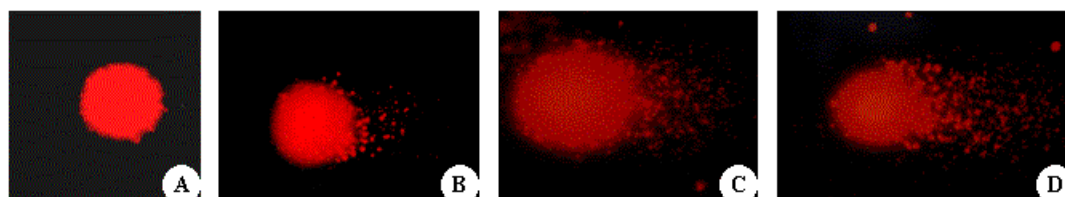


Figura 1. Ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição às águas do rio Paraíba do Sul. **A.** Classe 0 (DNA intacto); **B.** Classe 1 (DNA com baixo nível de dano); **C.** Classe 2 (DNA com nível médio de dano); **D.** Classe 3 (DNA com nível alto de dano). Aumento 1000x.

Nota: classificação dos nucleóides segundo Kobayashi et al. (1995).

De acordo com Kamman *et al.* (2001), a fragmentação ou quebra de fitas de DNA é considerada uma lesão potencialmente pré-mutagênica, pois tais quebras estão correlacionadas com muitas propriedades mutagênicas e carcinogênicas de diversos poluentes ambientais. As quebras que ocorrem na dupla fita de DNA são mais relevantes, pois são mais difíceis de serem reparadas, podendo constituir, posteriormente, lesões letais ou mutagênicas nos organismos expostos (Collins *et al.*, 1997).

Geralmente, vários fatores afetam o grau de poluição de um rio, como condições hidrológicas e climáticas do ecossistema. Variações sazonais desses fatores têm um grande efeito na concentração de poluentes no meio aquático (Vega *et al.*, 1998, Ferreira *et al.*, 1994).

Nesse sentido, Souza e Fontanetti (2006), aplicaram o teste do micronúcleo em eritrócitos de *O. niloticus* expostos às águas do rio Paraíba do Sul. As autoras sugeriram que chuvas escassas no inverno provocaram uma maior concentração de poluentes no rio, resultando numa frequência significativa de micronúcleos na estação seca, diferentemente do que ocorreu na estação chuvosa. Contudo, no presente trabalho, diferenças sazonais não foram

observadas. Possivelmente, esse fato pode ser explicado pelo fato do ensaio do cometa ser mais sensível que o teste do micronúcleo. Enquanto o ensaio do cometa detecta lesões reversíveis, o teste do micronúcleo detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados (Hartmann *et al.*, 2001); os danos mensurados pelo ensaio do cometa aparecem mais cedo do que o micronúcleo, que requer uma divisão celular para ser visualizado (Deventer, 1996).

Embora, ainda sejam escassos os estudos em que o ensaio do cometa *in vivo* é aplicado em espécies de peixes, nossos resultados confirmaram a utilização desta técnica como uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade no meio aquático, corroborando com os resultados obtidos por Pandrangi *et al.* (1995) e Russo *et al.*, (2004).

5. CONCLUSÕES

O rio Paraíba do Sul não é considerado poluído pela população e autoridades locais, sendo permitido qualquer tipo de atividade em suas águas. Contudo, seria conveniente que os antigos conceitos de poluição fossem revistos, uma vez que, no presente estudo, ficou evidente o potencial de risco de suas águas sobre o sistema-teste utilizado, principalmente no ponto de despejo da refinaria de petróleo. Apesar deste efluente receber tratamento antes de ser lançado no rio, diante dos resultados obtidos neste trabalho, constatou-se que tal tratamento não é eficiente para a eliminação de agentes genotóxicos. A continuidade de estudos biológicos, para a detecção de genotoxicidade é de extrema importância para monitorar os locais mais comprometidos do rio Paraíba do Sul. Tal monitoramento poderia levantar subsídios para a melhoria da qualidade do efluente das indústrias potencialmente poluidoras.

Agradecimentos

Agradecemos a Profa. Dra. Dejanira Francheschi de Angelis do Laboratório de Toxicidade de Águas - Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro, ao Valdenilson José Alves de Oliveira e ao Marcelo Sousa Camargo pela coleta das amostras de água, a Profa. Dra. Eliana Gonçalves da UNESP de São José do Rio Preto, por ter nos cedido os exemplares de *Oreochromis niloticus*, ao Departamento de Controle de Espaço Aéreo – Serviço de Proteção ao Voo de São Paulo por ter nos fornecido os dados ambientais da cidade de São José dos Campos e ao Programa de Recursos Humanos da ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista - UNESP-Rio Claro e a FUNDUNESP pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLAH, G. A.; EL-FAYOUMI, R. I.; SMITH, M. J.; HECKMANN, R. A.; O'NEILL, K. L. A comparative evaluation of aflatoxin B₁ genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 446, p. 181-188, 1999.

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 13, n. 5, p. 333-336, 1994.

ALVES-COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. 2001. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

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

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

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, New York, v. 11, p. 485-492, 1996.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538, p. 81-91, 2003.

CAIRNS, J.; McCORMICK, P. V.; NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 263, p. 1-44, 1993.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKA, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it tell us? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, p. 183-193, 1997.

DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *Danio rerio* by means of single cell gel electrophoresis. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 56, p. 911-918, 1996.

FERREIRA, C. J. A.; SORIANO, B. M. A.; GALDINO, S.; HAMILTON, S. K. Anthropogenic factors affecting waters of the Pantanal wetland and associated rivers in the upper Paraguay river basin of Brazil. **Revista Limnológica Brasiliensis**, v. 5, p. 135-148, 1994.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 491, p. 39-44, 2001.

HAMOUTENE, D.; PAYNE, J. F.; RAHIMTULA, A.; LEE, K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 54, p. 471-474, 2002.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J., B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 1-32, 1990.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 90, p. 183-188, 1997.

HAYASHI M.; UEDA T.; UYENO K.; WADA K.; KINAE N.; SAOTOME K.; TANAKA N.; TAKAI A.; SASAKI Y. F.; ASANO N.; SOFUNI T.; OJIMA Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

HILSDORF, A. W. S.; PETRERE JR, M. Conservação de peixes na Bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, n. 180, p. 62-65, 2002.

KAMMAN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 498, p. 61-77, 2001.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, Bethesda, v. 6, p. 21-27, 1981.

KLIGERMAN A. D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: HEDDLE J. A. (ed). **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**, Academic Press, 1982. p.435-456.

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

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 potential genotoxicity of polluted water. **Folia biologica**, Kraków, v. 45, n. 3-4, p. 153-156, 1997.

LEE, R. F.; STEINERT, S.A.; NAKAYAMA, K.; OSHIMA, Y. Use of DNA damage (comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos,. In: HENSHEL, D. S.; BLACK, M. C; HARRASS, M. C. (Eds.). **Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment**, v. 8, ASTM STP 1364, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, 1999. p. 341-349.

MARIANO, J. B. Impactos ambientais do refino do petróleo. 2001. 279 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético), Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2001.

MATSUMOTO, S. T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS, J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships and indices. **Water Research**, New York, v. 16, p. 129-139, 1982.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, Barking, v. 60, p. 101-139, 1989.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000, 295 p.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 367, p. 245-251, 1996.

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

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

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, p. 345-356., 1995.

PILOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogenesis. In: KLAASEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5 ed. New York: McGraw Hill, 1996. 201-267p.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, n. 4928, p. 352-358, 1989.

PRATT, J. M.; COLER, R. A. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. **Water Research**, New York, v. 10, p. 1019-1025, 1976.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 225-254, 1999.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.57, p. 168-174., 2004.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, J. I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating assymetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 412, p. 219-225, 1998.

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S. MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 393, n. 1-2, p. 133-139, 1997.

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

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; CCHEEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 1, n. 175, p. 184-191, 1988.

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

STARLING, F. L. R. M. **Development of biomanipulation strategies for the remediation of eutrofication problems in an urban reservoir, Lago Paranoá, Brazil**. PhD Thesis. University of Stirling, Scotland, 1998.

TABAN, I. C.; BECHMANN, R. K.; TORGRIMSEN, S.; BAUSSANT, T.; SANNI, S. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 58, p. 701-705, 2004.

TANAKA, P. R. **O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro – SP)**. 2001. 40 f. (Trabalho de Conclusão de Curso- Ecologia). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.

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

VEGA, M.; PARDO, R.; BARRADO, E.; DEBÁN, L. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. **Water Research**, Amsterdam, v. 32, n. 12, 3581-3592, 1998.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

COMET ASSAY TO ASSESSMENT WATER QUALITY OF PARAÍBA DO SUL RIVER, UNDER PETROLEUM REFINERY INLUENCE

Tatiana da Silva Souza¹ (Paulista State University), Carmem Silvia Fontanetti² (Paulista State University)

¹ Department of Biology, Institute of Biosciences, UNESP/ Rio Claro, Brazil, tssouza@rc.unesp.br

² Department of Biology, Institute of Biosciences, UNESP/ de Rio Claro, Brazil, fontanet@rc.unesp.br

Aquatic environment is affected by industrial discharge effluent, also the petroliferous one. To enhance protection of the aquatic environment, future regulations will have consider the potential of effluents to cause subtle, though harmful, effects in the aquatic biota. Currently, biological tests had been useful to assessment environmental pollution. Comet assay is useful for assessment damage in DNA (genotoxicity). In the present work comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) were performed to diagnose the water quality of Paraíba do Sul in an area that receives refinery oil effluent after treatment (São José dos Campos-SP, Brazil). The colleting procedure was performed in May, August and November 2004 and January 2005. Three collection sites were established: Site 1 (S1) – upstream the waste discharge; Site 2 (S2) – located at the point where the wastes from oil shale plant are released and Site 3 (S3) – downstream the waste discharge. Well water was used as negative control. ANOVA associated Dunnet test was designed to verify the significance of the experiments. It was possible to detect the presence of substances with genotoxic substances in the sites S2 and S3, in every month of collection. Therefore, it did not have any seasonal influence. In conclusion the water of Paraíba do Sul River is compromised at the petroleum refinery influence area; and genetic assay could be routinely applied to monitor the aquatic environment. We expect that this work, can subsidize institucional actions, aiming at the quality of life of the population and biota aquatic.

Key-words: Biomonitoring, Paraíba do Sul river, petroleum refinery, genotoxicity, Oreochromis niloticus

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo desse artigo