

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS IMPACTADAS POR PETRÓLEO POR MEIO DE SISTEMA-TESTE BIOLÓGICO (*Allium cepa*) - UM ESTUDO DE CASO

Daniela Morais Leme, Maria Aparecida Marin-Morales

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Av. 24A, 1515.
Bela Vista. CEP 13506-900. Rio Claro – SP.
email:dmlleme@rc.unesp.br

A importância da indústria petrolífera, dentro de toda a cadeia produtiva do petróleo, não se resume apenas ao ponto de vista estratégico de produção de derivados, mas também do de assegurar a qualidade do meio ambiente, uma vez que suas atividades podem gerar impactos desde a extração até o refino de seus produtos. Dentre os meios bióticos, o meio aquático é um dos mais preocupantes em relação aos impactos sofridos por este setor em decorrência de vazamentos acidentais de óleos e aos efluentes das refinarias de petróleo. Sabe-se que vazamentos de óleo podem levar a um sério comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, bem como conferir sérios riscos à vida dos organismos expostos. Sabe-se ainda que um dos mais sérios riscos conferidos aos organismos expostos é aquele que compromete o material genético dos mesmos, pois tais alterações podem causar inúmeros efeitos adversos à saúde. Portanto, devido à necessidade de assegurar a qualidade dos ecossistemas aquáticos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, pelo sistema-teste de *Allium cepa*, os potenciais genotóxico e mutagênico de águas do rio Guaecá, São Sebastião-SP, impactadas por vazamento de oleoduto em fevereiro de 2004. As amostras de águas foram coletadas em dois períodos sazonais, julho de 2005 (estação seca) e fevereiro de 2006 (estação chuvosa), em 4 pontos do rio Guaecá. Análises químicas de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) foram realizadas para as amostras coletadas, com a finalidade de dar suporte às investigações biológicas. Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação nas amostras coletadas e nos tratamentos controles negativo (água ultra pura) e positivo (metil metanosulfonato). Dos resultados obtidos, foi detectado potencial genotóxico e mutagênico somente para a amostra de água coletada na estação seca na nascente do rio, a qual corresponde ao local de afloramento do óleo vazado para o rio e a única amostra a apresentar, segundo a análise química, hidrocarbonetos de petróleo. Tais resultados levaram a conclusão de que as águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo podem comprometer a biota associada a este recurso, devido à indução de efeitos genotóxicos e mutagênicos sobre organismos expostos. Sugere-se ainda que os efeitos observados no presente trabalho sejam, provavelmente, decorrentes da presença dos PAHs quantificados pelas análises químicas, uma vez que tais xenobióticos são reconhecidos pela sua ação como potentes carcinógenos ambientais. Concluiu-se também que vazamentos de oleodutos em rios, se gerenciados corretamente, com a realização de planos adequados de contingências do acidente pela empresa poluidora, como a remoção e contenção do óleo vazado, podem levar a uma recuperação da qualidade das águas, como foi observado no caso do rio Guaecá, onde, após operações de limpeza do rio, hidrocarbonetos de petróleo não foram mais detectados pelas análises químicas e, consequentemente, ausência de efeitos danosos, como o observado pelo teste de *Allium cepa* para as amostras coletadas em fevereiro de 2006.

Palavras-chave: *Allium cepa*, efeitos genotóxicos, efeitos mutagênicos, águas poluídas, hidrocarbonetos de petróleo.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a indústria petrolífera vem sendo considerada como uma atividade humana de risco ao meio ambiente, pois pode promover impactos desde o processo de extração até o refino de seus produtos. Entretanto, dentre os riscos conferidos aos diferentes ambientes, os mais preocupantes são aqueles relacionados com o comprometimento dos recursos hídricos, os quais podem ser gerados por todas as etapas de produção deste setor industrial.

Em relação aos impactos gerados pela etapa de transporte da indústria petrolífera, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) vem registrando, desde 1980, acidentes ambientais por vazamentos de dutos e de navios petroleiros. Embora as ocorrências desses acidentes não sejam tão constantes, quando comparadas a outros acidentes, eles apresentam consequências sérias para o meio ambiente como um todo, bem como para a população exposta.

Sabe-se que o petróleo apresenta uma composição química complexa, variável e influenciada pelas condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado. Entretanto, independentemente de sua composição, o petróleo apresenta diversos efeitos deletérios aos organismos expostos, podendo causar,

mesmo em concentrações muito baixas, desde efeitos tóxicos crônicos, como diminuição ou inibição da capacidade reprodutiva, até efeitos genotóxicos e mutagênicos. Desta maneira, impactos causados por derrames de óleo não estão apenas associados ao volume derramado, pois pequenos vazamentos podem causar severos danos às áreas atingidas e aos organismos expostos.

Dentre as áreas mais atingidas por estes tipos de acidentes no Brasil, o Litoral Norte do Estado de São Paulo vem se destacando, devido à presença do Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), o qual é, atualmente, considerado o maior porto da PETROBRAS, sendo responsável por cerca de 60% do fluxo de carga no Brasil (CETESB, 2005). Adicionalmente, dentre os acidentes do Litoral Norte, temos como destaque os rompimentos de oleodutos localizados no Parque Estadual da Serra do Mar, devido a se tratar de uma área de Unidade de Conservação, com alta biodiversidade e inúmeros corpos d'águas.

Considerando a problemática exposta acima e a necessidade de assegurar a qualidade das águas, têm sido desenvolvidas metodologias de avaliação e monitoramento de ecossistemas aquáticos utilizando-se de organismos vivos, como a espécie *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae). Esta espécie tem se mostrado eficiente na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos pela poluição ambiental em geral e, principalmente, para estudos de águas impactadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Muitos problemas de saúde humana, incluindo alguns tipos de câncer, atualmente, são atribuídos à presença de diversos contaminantes presentes no meio ambiente e na água, em particular (FATIMA e AHMAD, 2006). Dentre todos os hidrocarbonetos descritos, a classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), também presentes no petróleo, tem sido indicado como um dos mais perigosos contaminantes ambientais, devido aos seus efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (AINA et al., 2006).

O aumento significativo da poluição ambiental e a crescente preocupação com o bem-estar social têm levado pesquisadores a desenvolverem testes biológicos eficientes, pois estes são indispensáveis para a avaliação de reações de organismos vivos frente à contaminação ambiental complexa, bem como para indicar os efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes presentes no meio ambiente. Desta forma, a garantia e manutenção de ambientes seguros requerem testes padrões para avaliação de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos de fácil execução e de rápida obtenção de resultados, além de serem facilmente reproduzíveis (FISKESJÖ, 1985).

Considerando as necessidades mencionadas acima, sistemas-teste vegetais vêm se destacando como excelentes modelos genéticos para triagem e monitoramento de poluentes ambientais (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994). Tal destaque não se deve apenas a sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, mas também pela possibilidade de avaliação de diversos “endpoints” genéticos, os quais abrangem desde mutações pontuais até aberrações cromossômicas em células e/ou em órgãos como folhas, pólen e endospermas (GRANT, 1994).

Dentre os vegetais superiores utilizados como modelos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se mostrando um eficiente modelo genético de monitoramento ambiental. Desde a introdução desta espécie como sistema-teste (LEVAN, 1938), adaptações na metodologia do teste de *A. cepa* têm sido realizadas a fim de possibilitar uma melhor avaliação da contaminação ambiental complexa (FISKESJÖ, 1985; RANK e NIELSEN, 1993; MA et al., 1995). Tais adaptações possibilitaram uma maior abrangência de utilização deste teste, além de destacar a sua sensibilidade, para a detecção de danos genéticos induzidos por poluentes ambientais presentes em diversos ambientes e em especial na água (RANK e NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; COTELLE et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2006; LEME e MARIN-MORALES, 2006; FATIMA e AHMAD, 2006; MIGDI et al., 2007).

A espécie de *A. cepa* tem sido indicada pela sua alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Sabe-se que tais fatores são fundamentais para avaliação mais precisa de riscos ambientais, bem como para a extrapolação de dados para outros organismos alvos, como, por exemplo, o homem (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1982). Desta maneira, Fiskesjö (1985) constatou para o teste de *A. cepa*, praticamente a mesma sensibilidade que sistemas-teste de algas e de linfócitos humanos. Rank e Nielsen (1994) mostraram, além da maior sensibilidade do teste de *A. cepa* em relação aos testes de Ames e *Microscreen*, uma correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores. Além disso, estudos de sensibilidades entre vegetais superiores têm mostrado maior sensibilidade da espécie *A. cepa* em relação a outros organismos-teste, como, por exemplo, o de *Vicia faba* (MA et al., 1995; MIGDI et al., 2007).

A partir do conhecimento de que a contaminação ambiental por hidrocarbonetos, principalmente pelos PAHs, pode causar diversos danos à saúde humana, e que uma das importantes fontes de contaminação são as atividades da indústria petrolífera, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por águas impactadas por petróleo, usando *Allium cepa* como sistema-teste.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Área de Estudo e Procedimento de Coleta das Amostras de Águas

O rio Guaecá, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, São Sebastião-SP, Brasil, foi usado no presente trabalho como área de estudo (Figura 1). Este rio, situado em uma área de preservação permanente, a qual é caracterizada pela alta biodiversidade e pela proximidade da estação de captação de água para abastecimento, foi impactado por vazamento de petróleo em fevereiro de 2004, devido ao rompimento do oleoduto da região. Por se tratar de um duto subterrâneo, o óleo vazado atingiu, primeiramente, as águas subterrâneas, sendo, posteriormente, aflorado na nascente do rio Guaecá, afetando todo o curso deste rio.

As coletas foram realizadas em julho de 2005 (estação de seca) e fevereiro de 2006 (estação de chuva). As amostras foram coletadas em 4 pontos distintos, ao longo dos 8 Km do rio Guaecá, como descrito a seguir: ponto 1 (P1), nascente do rio e local de afloramento do óleo vazado; ponto 2 (P2), principal ponto de contenção e remoção de óleo do rio, estabelecido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo – Brasil), empresa responsável pela fiscalização da área; ponto 3 (P3), ponto de menor declividade do rio e ponto 4 (P4), foz do rio (Figura 1).

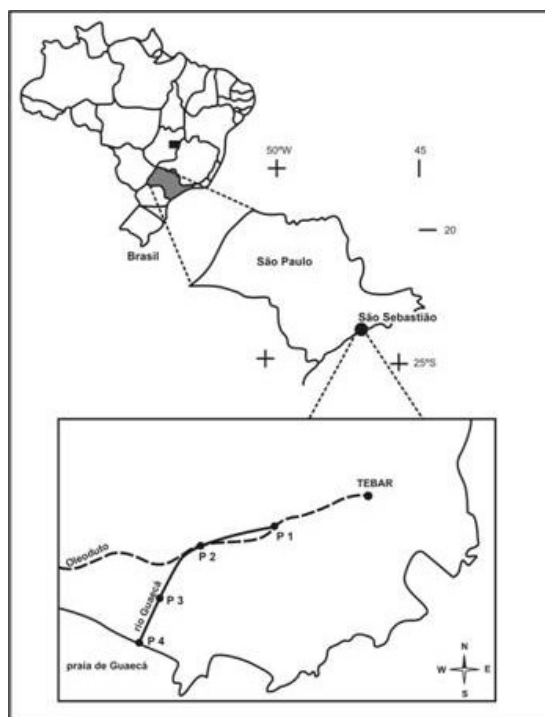


Figura 1. Localização do Município de São Sebastião, dos pontos de coleta no rio Guaecá e do oleoduto (linha tracejada) responsável pelo impacto de óleo no referido rio (linha cheia). P1: nascente do rio e local de afloramento do óleo vazado; P2: principal ponto de contenção e remoção de óleo do rio; P3: ponto de menor declividade do rio; P4: foz do rio.

O procedimento de coletas das amostras de água foi realizado segundo a metodologia de coleta de águas superficiais, descrita pela CETESB (1987). Galões plásticos novos, com capacidade de 20L, foram utilizados para a coleta das amostras destinadas aos testes com *Allium cepa*. Para as coletas das amostras destinadas às análises químicas de hidrocarbonetos, utilizou-se frascos de vidro, com capacidade de 2L, previamente tratados com HCl 50%. Os recipientes foram, primeiramente, submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem previa do mesmo com a água do ponto a ser coletado. Após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos, porém, em locais correspondentes aos pontos médios da largura do rio, até o completo preenchimento de seu volume. Após a coleta das amostras de águas, os recipientes foram, imediatamente, lacrados e refrigerados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, para o transporte e, conseqüente, realização das análises.

Dados meteorológicos referentes aos períodos das coletas realizadas no rio Guaecá foram obtidos junto à Estação Meteorológica do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da Universidade de São Paulo (USP), Brasil (Tabela 1). De acordo com estes dados, julho de 2005 apresentou o menor índice de chuvas deste ano, caracterizando a estação de seca, enquanto que fevereiro de 2006 representou a estação chuvosa por apresentar um alto índice pluviométrico.

Tabela 1. Dados meteorológicos referentes aos períodos de coletas das amostras no rio de Guaecá, São Sebastião - SP.

Mês	Média de temperatura máxima (°C)	Média de temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Índice de Chuva (mm)
Julho 2005	33,14	15,39	85,43	0,008
Fevereiro 2006	35,9	21,06	89,43	0,043

3.2. Organismo-teste

Sementes da espécie de *Allium cepa* (variedade baia periforme) foram utilizadas como organismo-teste por caracterizar-se em um material de análise mais homogêneo, tanto genética como fisiologicamente, acessível durante o ano inteiro, o que proporcionou uma maior confiabilidade para os ensaios realizados.

3.3. Metodologia

Os ensaios de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa*, foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações, descritas abaixo. Sementes de cebola, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram submetidas à germinação nas diferentes amostras de águas coletadas, sendo utilizada uma placa de Petri para cada ensaio. Devido a grande quantidade de frações visíveis de óleo presentes na amostra do ponto 1, coletada em julho de 2005, também foi realizado um ensaio com esta amostra filtrada em papel filtro de celulose. Quando as radículas atingiram cerca de 2.0 cm de comprimento, elas foram coletadas e fixadas em ácido álcool-acético (3:1-v/v) por 24 h. Após a fixação, as raízes foram submetidas à coloração em reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas. Água ultrapura foi usada para o teste controle negativo, e 4×10^{-4} M de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) para o controle positivo.

Para a análise de AC, vários tipos de aberrações foram considerados - fragmentos cromossômicos, perdas de cromossomos, pontes, atrasos, aderências, entre outros - nas diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase), sendo todos os registros reunidos em uma só categoria para possibilitar a avaliação das AC como um único *endpoint*. A incidência de MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi considerada como outro parâmetro de avaliação, não sendo agrupada junto com as AC. O Índice Mitótico (IM), que corresponde à relação do número de células em divisão, constituiu um terceiro parâmetro de avaliação. A análise de todos estes parâmetros se deu pela contagem de cerca de 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina para um total de 10 lâminas. Análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, o qual possibilita a comparação dos tratamentos com controle negativo, bem como dos tratamentos entre si, em nível de significância de 0,05.

3.4. Análises Químicas

Análises químicas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPHs) e de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) de amostras de água coletadas no rio Guaecá e Ribeirão SABESP foram realizadas pela empresa Analytical Technology, São Paulo-SP.

Para a análise de TPHs, foi seguido o método USEPA 8015, o qual utiliza a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (Gcfid). A análise de PAHs seguiu o método USEPA 8270, com a utilização da técnica de cromatografia gasosa com detector de massas (Gcms), a qual é capaz de detectar os PAHs listados a seguir: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(123-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

4. RESULTADOS

Dentre as amostras submetidas à análise química, apenas a amostra de água do ponto 1, coletada em julho de 2005, apresentou valores de TPHs e PAHs acima dos limites de detecção do método adotado para esta análise (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPHs) detectados pela análise química na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (inverno).

Amostra	Ponto de coleta	TPHs	Concentração (µg/l)	Limite Detecção (µg/l)
Julho 2005	ponto 1	C12	148.34	50,00
		C13	148.34	50,00
		C14	310.40	50,00
		C15	271.53	50,00
		C16	261.53	50,00
		C17	966.30	50,00
		C18	509.27	50,00
		Total de n-alcanos	2615.71	
		MCNR	79896.62	

MCNR: Mistura complexa não-resolvida

Tabela 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) detectados pela análise química na amostra de água do ponto 1 do rio Guaecá, coletada em junho de 2005 (inverno).

Amostra	Ponto de coleta	PAHs	Concentração (µg/l)	Limite Detecção (µg/l)
Julho 2005	ponto 1	naftaleno	7.08	0,25
		acenaftileno	4.56	0,25
		acenafteno	1.91	0,25
		fluoreno	15.12	0,25
		fenantreno	78.78	0,25
		pireno	9.43	0,25
		benzo(a)antraceno	3.82	0,25
		criseno	18.88	0,25
		Total of PAHs	139.58	

Os resultados obtidos para os testes de AC e MN, usando o sistema-teste de *Allium cepa*, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação das Frequências de Índice Mitótico, Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição às amostras de águas do rio Guaecá.

Amostra	Pontos de coleta	Número de células analisadas	Índice Mitótico	Aberrações Cromossômicas	Micronúcleos
Julho 2005	controle negativo	5000	17.32±16.26	0.86±2.02	0.125±0.87
	controle positivo	5000	18.46±13.71	4.00±8.00 ^a	0.54±2.17
	ponto 1	5000	15.00±8.00	7.5±21.73 ^a	2.72±8.27 ^a
	ponto 1 – água filtrada	5000	19.57±17.40	8.20±25.55 ^a	3.86±22.46 ^a
	ponto 2	5000	15.10±8.76	3.36±3.73	0.26±1.37 ^b
	ponto 3	5000	18.55±11.06	4.16±5.00*	0.52±3.37 ^b
	ponto 4	5000	15.88±16.81	3.41±5.57	0.25±1.10 ^b
Fevereiro 2006	controle negativo	5000	29.20±10.96	1.34±2.32	0.14±1.06
	controle positivo	5000	32.26±11.87	1.45±2.72	2.10±7.20 ^a
	ponto 1	5000	31.21±16.46	1.10±2.64	0.84±4.00
	ponto 2	5000	31.34±11.35	1.5±2.51	0.78±2.86
	ponto 3	5000	30.62±14.12	1.33±3.77	1.28±8.48
	ponto 4	5000	31.28±21.07	1.86±3.63	1.62±5.34

média±D

^a diferença significativa em relação ao controle negativo (p<0.05), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis

^b diferença significativa em relação à amostra de água do ponto 1 de Julho de 2005 (p<0.05), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Para os IM, foram observadas diferenças de valores entre os ensaios realizados para as duas coletas, sendo obtidos valores mais baixos para os tratamentos da primeira coleta (julho de 2005), em relação à segunda

(fevereiro de 2006). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os IM dos tratamentos, quando comparados com o controle negativo, para nenhum dos ensaios realizados.

As frequências de AC observadas nas células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição nas águas coletadas no rio Guaecá, em geral, se mostraram superiores às encontradas para o controle negativo, embora nem todas as diferenças foram significativas estatisticamente. Somente as frequências de AC observadas para as amostras dos pontos 1 e 3, da coleta de julho de 2005, apresentaram valores significativos em relação ao controle negativo. No entanto, quando analisadas as frequências de MN das células meristemáticas expostas a amostra de água coletada no ponto 1 (estação seca), observamos um valor significativamente maior do que o obtido para o controle negativo. Esta análise, quando comparada com as frequências de MN, obtidas para as demais amostras do rio Guaecá (estação seca), também se mostrou significativamente maior. Para os ensaios realizados com a amostra filtrada do ponto 1, coletada em julho de 2005, não observamos diferenças significativas das frequência de AC e MN, em relação a mesma amostra não filtrada. Porém, como descrito para a amostra não filtrada, valores significativos foram obtidos em relação ao controle negativo.

5. DISCUSSÕES

O Índice Mitótico (IM) tem se mostrado um importante parâmetro para a avaliação dos efeitos de agentes químicos sobre o ciclo celular (SMAKA-KINCL et al., 1996; KURAS et al., 2006; TÜRKÖGLÜ, 2007). As diferenças observadas para os valores de IM nos dois experimentos realizados no presente estudo, não parecem estar relacionadas com as características particulares de cada amostra testada, mas sim aos fatores climáticos, uma vez que os ensaios foram realizados em diferentes estações do ano. Desta maneira, observou-se que no inverno, o IM se mostrou menor, devido a uma diminuição da divisão celular, decorrente das temperaturas mais baixas deste período, enquanto que no verão, este índice exibiu valores maiores para todos os testes realizados.

Aberrações cromossômicas (AC) são reconhecidas como importantes consequências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002), aos quais muitos organismos, inclusive o homem, estão expostos. Estudos epidemiológicos têm mostrado que pessoas com elevadas frequências de AC apresentam maiores riscos de desenvolvimento de câncer (OBE et al., 2002). Por estas razões, testes biológicos para avaliação de AC como *endpoint* de agentes químicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de garantir um ambiente seguro. Dentre estes sistemas-teste, o teste de *Allium cepa* tem se caracterizado como um modelo rápido e eficiente na avaliação da genotoxicidade causada por poluentes ambientais (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994; FISKESJÖ, 1988; FISKESJÖ e LEVAN, 1993; FISKESJÖ, 1993; NIELSEN e RANK, 1994), bem como para a avaliação de qualidades de águas (FATIMA e AHMAD, 2006; MATSUMOTO et al., 2006).

De acordo com o presente estudo, as análises dos dados obtidos para as células meristemáticas mostraram que a análise individual da categoria AC não foi totalmente eficiente para a avaliação de genotoxicidade das águas do rio Guaecá, após impacto por petróleo, pois observou-se resultados significativos de AC tanto para a amostra mais impactada por óleo (ponto 1), como para a amostra não impactada (ponto 3), segundo os resultados das análises químicas. No entanto, a avaliação da indução de MN em células meristemáticas de *Allium cepa*, junto com o teste de AC, possibilitou uma análise precisa da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que apenas para a amostra do ponto 1, de julho 2005, foi observada frequência significativa, não só em relação ao controle negativo, como também em relação aos demais pontos de coleta do rio Guaecá. Tal amostra corresponde ao local de afloramento do óleo vazado para o rio, sendo a única amostra para a qual foi detectada a presença de TPHs e PAHs pelas análises químicas.

Devido a grande presença de óleo na amostra do ponto 1, referente à coleta de julho de 2005, foi realizado teste com a amostra submetida a filtração para compreender a relação entre os possíveis danos causados pelas frações dispersas e aparentemente não visíveis e visíveis do óleo vazado. Os valores de AC e MN não foram significativos entre estas amostras (filtrada e não filtrada), indicando que a indução de AC e MN nas células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição a água coletada no ponto 1, deve estar relacionadas com a presença das frações dispersas do óleo presentes na amostra, conforme constatado nas análises químicas pela detecção de TPHs e PAHs.

Apesar do teste de *A. cepa* ter grande aceitação como teste de monitoramento ambiental, alguns autores apresentam certa restrição quanto a utilização de sistemas-teste vegetais na avaliação de certas classes de carcinógenos, como a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), das nitrosaminas e de algumas outras (UHL et al., 2003; RANK e NIELSEN, 1998). Tal fato é devido ao complexo sistema de metabolização, necessário para ativação do potencial genotóxico destas substâncias, e que estão presentes em mamíferos e no homem. No entanto, estudos de sistemas de ativação metabólica em plantas vêm sendo realizados, há anos, e a capacidade de vegetais superiores ativarem promutágenos em mutágenos já foi comprovada por vários pesquisadores (HIGASHI, 1988; PLEWA et al., 1996; PLEWA et al., 2003). Contudo, sabe-se que alguns dos metabólitos produzidos por esta via diferem daqueles gerados pela via de metabolização de mamíferos (RUEFF et al., 1996).

Apesar da controvérsia exposta acima, a importância do sistema-teste de *Allium cepa*, para avaliação da genotoxicidade de PAHs, foi mostrada por Fiskejö em 1985 com a utilização de benzo[a]pireno. Segundo o autor, as células de *Allium cepa* apresentam um sistema de enzimas oxidases capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos e, apesar de outros sistemas-teste se mostrarem mais sensíveis, os resultados gerados pelo teste de *Allium cepa* devem ser considerados como alarme, alertando para a possibilidade de ação semelhante em outros organismos. Nossos dados corroboram com a afirmação de Fiskejö (1985), pela alta sensibilidade observada no teste de *Allium cepa* realizado com as águas do rio Guaecá, impactadas pelo vazamento de óleo, uma vez que mutagenicidade foi observada, apenas, para a amostra na qual foi detectada presença de TPHs e PAHs pelas análises químicas.

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que, águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo podem apresentar efeitos genotóxicos e mutagênicos sobre organismos expostos, como mostrou claramente o caso do rio Guaecá, pela mutagenicidade observada apenas para a amostra na qual foi detectada a presença de TPHs e PAHs pela análise química. Além disso, sugere-se que os valores significativos de AC e MN, observados nas células de *Allium cepa* sejam, provavelmente, decorrente da ação dos PAHs presentes na amostra contaminada, uma vez que é sabido que PAHs são perigosos carcinógenos ambientais.

Concluiu-se também que vazamentos de oleodutos em rios, se gerenciados de maneira correta, com a realização de planos adequados de contingências do acidente pela empresa poluidora (CETESB, 2005), com a remoção e contenção de óleo vazado, podem levar a uma recuperação da qualidade das águas, como foi observado para o rio Guaecá, uma vez que não foram detectados impactos por hidrocarbonetos nem nas análises químicas, nem nos testes de AC e MN para as amostras coletadas em fevereiro de 2006.

Por fim, concluiu-se ainda que o sistema-teste de *A. cepa* foi sensível para a análise proposta, se mostrando um modelo eficiente na detecção de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo.

7. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao Dr. João Carlos C. Milanelli e ao Instituto Florestal, São Sebastião-SP, Brasil, pela colaboração prestada durante as coletas realizadas; ao Centro de Biologia Marinha (CEBIMar), Universidade de São Paulo (USP), pelo fornecimento dos dados meteorológicos referentes aos períodos de coleta das amostras e ao Programa de Recursos Humanos ANP/FINEP/MCT-CTPETRO, PRH-05, Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Rio Claro pelo suporte financeiro.

8. 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.
- [CETESB] Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. Coord. Edmundo Garcia Agudo (et al.) São Paulo, 1987.
- [CETESB] Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Relatório Técnico: Acidente com o Oleoduto OSBAT – PETROBRAS / TRANSPETRO - GUAECÁ – SÃO SEBASTIÃO**. São Paulo, 2005.
- COTELLE, S.; MASFARAUD, J.-F.; FÉRARD, J.-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p.167-171, 1999.
- 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.
- 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.
- FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.8, p.291-298, 1993.
- FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MeIC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v.21, p.139-149, 1993.
- GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.
- GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185, 1994.
- HIGASHI, K. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. **Mutation Research**, v.197, p.273-288, 1988.

- KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.)DC. **Journal of Enthnopharmacology**, v.107, p.211-221, 2006.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região, utilizando o sistema-teste de *Allium cepa***. In: IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, São Pedro/SP, 2006.
- LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v.24, p.471-486, 1938.
- 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.
- MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.
- MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.57-64, 2007.
- NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, v.504, p.3-16, 2002.
- NIELSEN, M.H.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity of wastewater by the use of the *Allium cepa* test. **Hereditas**, v.121, p.249-254, 1994.
- 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.
- PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; STAVREVA, D.A.; GICHNER, T. Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. **Mutation Research**, v.350, p.163-171, 1996.
- PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; JU, Y.H. The plant activation of aromatic amines into unique high molecular weight agents that induced genomic DNA damage in mammalian cells. IN: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual**. Katowice, 2003. p.39-60.
- 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. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113-119, 1998.
- 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.
- 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.
- TÜRKÖGLÜ, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v.626, p.4-14, 2007.
- UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual**. Katowice, 2003. p.11-30.

EVALUATION OF THE WATER QUALITY POLLUTED BY PETROLEUM USING BIOASSAY (*Allium cepa*) – A CASE STUDY

The petroleum industry, beyond concerning with the production of petroleum-derived material, must take care with the environment quality, since its activities, from the oil extraction to the refinement, can cause severe impacts. Among the ecosystems, the aquatic is one of most vulnerable due to accidentals oil leakages and the refinery effluents dischargers. The presence of oil, frequently, compromise the water quality, exposing the living organisms to serious risks. Among them, the most serious risks are those ones that damage the genetic material, hence causing several health problems. Thus, due to the need of assure the aquatic systems quality, the present study aimed at analyzing the genotoxic and mutagenic effects induced by petroleum polluted waters, using *Allium cepa* root tips as test system. Guaecá river, located in the city of São Sebastião-SP, Brazil, was chosen as study area because had its waters affected by an oil pipeline leakage on February 18th, 2004. The water sampling were performed in July 2005 (dry season) and February 2006 (rain season), in four sites of Guaecá river.

Chemical analyses of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs) and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were also carried out to complement the bioassay data. Onion seeds were grown in the waters samples, in ultra pure water (negative control) and in aqueous solution of methyl methanesulfonate (positive control). Genotoxic and mutagenic effects were detected only to the sample collected during the dry season at the river spring - the place where the oil surfaced- and just where petroleum hydrocarbon were detected by chemical analyses. On the ground of the present data, we concluded that waters impacted by petroleum hydrocarbons can damage the DNA of exposed organisms. Moreover, we believe that the observed damages are, probably, due to the PAHs - dangerous carcinogens - dispersed in the polluted water. It is also concluded that rivers affected by oil pipelines leakage in rivers, when correctly managed, can have its waters quality recovered, as we observed for the Guaecá river.

Keywords: *Allium cepa*, genotoxic effects, mutagenic effects, water pollution, petroleum hydrocarbons.

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo deste artigo.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.