



PETROBRAS – REPLAN

**FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP –
FUNDUNESP**

PROJETO

Avaliação da toxicidade (atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica) do efluente final da refinaria e das águas do rio Atibaia na região de influência do lançamento.

**Convênio: 1 100 0033 001.07.4
Processo Fundunesp nº 817/2007**

**Local de execução: UNESP – Instituto de Biociências –
Campus de Rio Claro – Departamento de Bioquímica e
Microbiologia e Departamento de Biologia**

**Responsabilidade técnica: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi
de Angelis – CRB: 00588/84**

Período: junho de 2007 a setembro de 2008

**Rio Claro – SP
2008**

PARTICIPANTES DO PROJETO

COORDENAÇÃO:

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis
Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro

A – Petrobras – Refinaria de Paulínia – REPLAN

Engenheiro Dr. Daniel Teixeira Machado - Gerente Geral da Refinaria de Paulínia

Engenheiro Dr. Cláudio Magno Martins – Gerente de Saúde Meio Ambiente e
Segurança

Engenheiro Mauro José Lauro – Coordenador de Saúde e Meio Ambiente

Engenheira de Meio Ambiente Pleno - Márcia Aurélia Fabbri Sabbag

B - Fundação para o desenvolvimento da UNESP

Diretor Presidente: Prof. Dr. Luiz Antonio Vane

C – Pesquisadores

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis – Bióloga (Coordenadora)

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales – Bióloga (Citotoxicidade)

Prof. Dr. Antonio Carlos Pião – Matemático (Estatístico)

Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian - Bióloga

Profa. Dra. Derlene Atili de Angelis – Bióloga (Micologista)

Profa. Dra. Dilza Aparecida Nalin – Bióloga

Profa. Dra. Silvia Tamie Matsumoto – Bióloga

Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira (Farmacêutica)

Estudo das condições
toxicológicas do efluente da
REPLAN no Rio Atibaia.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OPERACIONALIZAÇÃO	2
3. RESULTADOS	6
3.1 Ensaio biológico de toxicidade com microcrustáceos	8
3.1.1 <i>Daphnia similis</i>	8
3.1.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	12
3.1.3 Ecotoxicidade das águas na dinâmica populacional de <i>Daphnia similis</i>	14
3.2. Avaliação do potencial mutagênico das águas do entorno da refinaria segundo o teste de Ames.	29
3.3 Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos efluentes da replan das águas do seu entorno, por meio de dois sistemas.	33
3.3.1 Introdução	33
3.3.2 Objetivos	34
3.3.3 Material	35
3.3.4. Métodos	35
3.3.4.1 Sistema-teste de <i>Allium cepa</i>	35
3.3.4.2 Sistema-teste de <i>Oreochromis niloticus</i>	36
3.3.5 Resultados e Discussão	38
3.3.6 Conclusão Geral	43
3.3.7 Referências Bibliográficas	43
3.4 Efeito mutagênico em cultura de células de mamíferos de ovário de hamster chinês – CHO-K1	46
3.4.1. Introdução	46
3.4.2 Objetivo	46
3.4.3 Material e métodos	46
3.4.4 Resultados	48
3.4.5 Conclusões	51
3.4.6 Referências	51
3.5. Ensaio biológico empregando o peixe <i>Danio rerio</i>	52
3.5.1 Introdução	52
3.5.2 Resultados	52
3.5.3 Conclusão	56
3.6. Análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.	57
4. CONCLUSÃO GERAL.	

1. INTRODUÇÃO

Este relatório contempla resultados de ensaios biológicos das águas dos Rios Jaguari, Atibaia, montante e jusante da descarga do efluente da Replan, tratado biologicamente.

Todas as análises foram realizadas de acordo com as normas da WHO, EPA, CETESB e STANDARD METHODS (1998) e da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese, Teratogênese Ambiental.

Neste relatório estão incluídos os seguintes ensaios:

- toxicidade aguda e crônica com microcrustáceos: *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*;
- mutagenicidade: *Salmonella thyphimurium* (Teste de Ames).
- mutagenicidade: *Allium cepa* (raiz de cebola);
- genotoxicidade: *Allium cepa* (raiz de cebola);
- genotoxicidade: *Oreochromis niloticus* (tilapia);
- mortalidade em células de mamíferos: Hamster chinês;

Além destas análises, constam os resultados da avaliação quantitativa dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

2. OPERACIONALIZAÇÃO

Para executar a primeira fase do projeto foram coletadas 18 amostras no período de agosto de 2007 a abril de 2008.

2.1. Amostras coletadas na seguinte programação:

N° da coleta	Dia	mês	ano
1	01	08	2007
2	15	08	2007
3	12	09	2007
4	26	09	2007
5	8	10	2007
6	24	10	2007
7	07	11	2007
8	21	11	2007
9	05	12	2007
10	12	12	2007
11	09	01	2008
12	30	01	2008
13	06	02	2008
14	17	02	2008
15	3	03	2008
16	19	03	2008
17	2	04	2008
18	28	04	2008

As coletas são executadas por: Valdenilson José Alves de Oliveira e Marcelo Souza Camargo.

2.2. Pontos de amostragem

Ponto	Local	Longitude (WO) Grau min seg.			Latitude (S) Grau min.seg.		
Ponto 1	Rio Jaguari_____	22	42	00,0	47	08	06,6
Ponto 3	Saída da Lagoa de _____ Estabilização	22	44	22,0	47	07	43,0
Ponto 4	Montante da descarga do _____ efluente da Replan	22	44	43,0	47	07	25,3
Ponto 5	Jusante da descarga do _____ efluente da Replan- 200m	22	44	25,3	47	07	35,2
Ponto 8	Jusante da descarga do _____ efluente da Replan- 500m	22	44	22,3	47	07	40,8

Dados obtidos no equipamento GPS – Garmin, eTrex Summit

A seguir as Figuras 1; 2; 3; 4 e 5, mostram os pontos de coleta das amostras.



Figura 1. Próximo ao ponto de captação do Rio Jaguarí (Ponto 1)



Figura 2. Saída do efluente na lagoa de estabilização (Ponto 3).



Figura 3. Rio Atibaia, montante da entrada do efluente industrial tratado (Ponto 4)



Figura 4. Jusante da entrada do efluente tratado no Rio Atibaia (Ponto 5).



Figura 5. Jusante Rio Atibaia, 500m da descarga do efluente tratado da Replan (Ponto 8)

As coletas foram efetuadas nos pontos indicados no diagrama 1

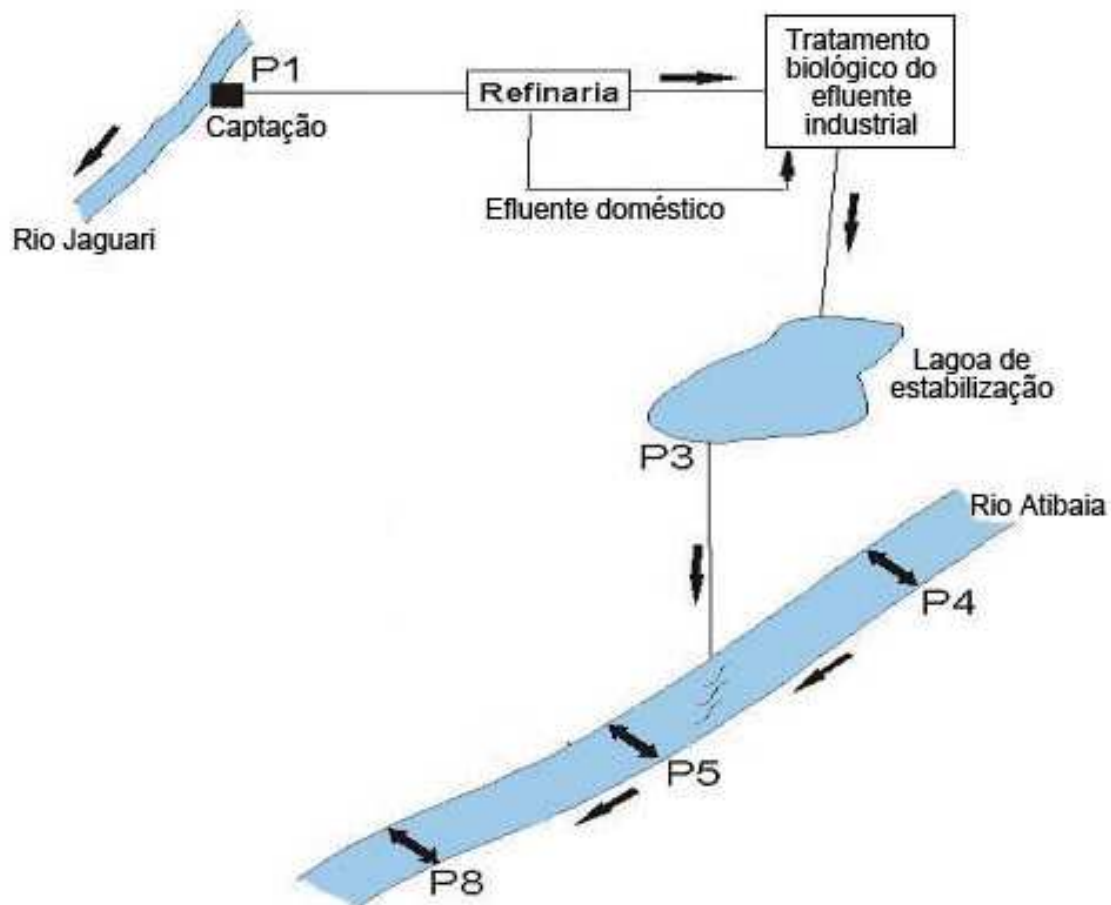


Diagrama 1. Esquema ilustrativo dos diversos pontos de amostragem para a realização deste estudo.

3. RESULTADOS

As análises toxicológicas atualmente assumem grande importância pelo fato de que muitos dos resultados obtidos das análises químicas e físicas mesmo contemplando quantitativamente a legislação não conferem condições de avaliar os efeitos sinérgicos da somatória das substâncias químicas sobre os seres vivos.

Na sociedade atual ainda existe a cultura de que água e o meio mais prático de descarte e afastamento de resíduos.

Assim, os rios passam a receber todo tipo de despejos seja minimamente tratados ou na sua forma bruta. Com o desenvolvimento da química estima-se que mais de 80.000 substâncias dispersam-se anualmente na água. Dentre estas estão os fármacos, agrotóxicos, pesticidas, monômeros de síntese, isômeros não aproveitados em reações derivadas da indústria petroquímica e outros.

Para contemplar a legislação sobre qualidade da água a Resolução CONAMA 357/2005 contempla 73 itens relativos às substâncias orgânicas. Entretanto, não há referência da somatória e ao sinergismo de seus efeitos sobre o ser vivo.

Embora o artigo 7º da Resolução em seu parágrafo único refere-se à:

“Eventuais interações entre as substâncias especificadas ou não na Resolução, não poderão conferir às águas características capazes de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida”.

O parágrafo 4º da Resolução *“refere-se ao fato da necessidade ser investigada utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos”.*

A Replan, preocupada com possíveis efeitos ambientais adiantou-se na verificação da qualidade das águas tratadas de seu efluente permitindo não somente análises pontuais mas vários trabalhos de pesquisa elaborados junto ao Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. Os resultados destes trabalhos sempre foram considerados pela empresa que busca sempre as melhores soluções para preservar o meio ambiente.

Nesta etapa dos trabalhos conveniados com a Replan foram executados os seguintes ensaios de toxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e ecotoxicidade.

- toxicidade aguda e crônica com microcrustáceos: *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*;
- mutagenicidade: *Salmonella thyphimurium* (Teste de Ames).
- mutagenicidade: *Allium cepa* (raiz de cebola);
- genotoxicidade: *Allium cepa* (raiz de cebola);
- genotoxicidade: *Oreochromis niloticus* (tilapia);
- mortalidade em células de mamíferos: Hamster chinês;
- análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Além destas análises, constam os resultados da avaliação quantitativa dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

3.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS DE TOXICIDADE COM MICROCRUSTÁCEOS

3.1.1 Toxicidade aguda empregando *Daphnia similis*.

Daphnia similis (Figura 6) é um microcrustáceo presente em água doce, faz parte da cadeia alimentar de outros animais especialmente peixes.



Figura 6. *Daphnia similis*, conhecida popularmente como “pulga d’água”.

Daphnia similis alimenta-se de micro algas presentes no ambiente aquático.

A metodologia de análise baseia-se na Norma L5. 018 ago/1991 da CETESB.

O ensaio biológico de toxicidade empregando *Daphnia similis* tem sua normatização estabelecida pelo Standard Methods (1975, Cetesb, 1991) e quando criada em condições padronizadas os animais são alimentados com *Selenastrum capricornutum*, microalga atualmente reconhecida como *Pseudokichneriella subcapata*.

Os ensaios com *D. similis* foram executadas inicialmente em 5 pontos durante as 18 coletas realizadas.

TABELA 1. Determinação da Toxicidade aguda CE (50) e Unidades Tóxicas (UT) mediante a aplicação de ensaio biológico empregando *Daphnia similis* nas amostras coletadas na captação de águas do rio Jaguarí saída da lagoa de estabilização (P3), Rio Atibaia montante (P4), jusante (P5) e (P8).

Nº de Coleta	PONTOS DE AMOSTRAGEM									
	1-Rio Jaguarí		3-Saída		4-Montante		5 - Jusante		8- Jusante	
	L.E.		Rio Atibaia		Rio Atibaia		Rio Atibaia		Rio Atibaia	
	CE(50)	UT	CE(50)	UT	CE(50)	UT	CE(50)	UT	CE(50)	UT
1	NT	-	92,83	1,08	NT	-	NT	-	NT	-
2	NT	-	84,92	1,18	NT	-	NT	-	NT	-
3	NT	-	84,92	1,18	NT	-	NT	-	NT	-
4	NT	-	89,44	1,12	NT	-	NT	-	NT	-
5	NT	-	90,88	1,10	NT	-	NT	-	NT	-
6	NT	-	92,83	1,08	NT	-	NT	-	NT	-
7	NT	-	91,46	1,04	NT	-	NT	-	NT	-
8	NT	-	94,57	1,06	NT	-	NT	-	NT	-
9	NT	-	84,81	1,18	NT	-	NT	-	NT	-
10	NT	-	85,67	1,17	NT	-	NT	-	NT	-
11	NT	-	98,93	1,11	NT	-	NT	-	NT	-
12	NT	-	92,21	1,08	NT	-	NT	-	NT	-
13	NT	-	87,36	1,14	NT	-	NT	-	NT	-
14	NT	-	90,86	1,10	NT	-	NT	-	NT	-
15	NT	-	94,57	1,06	NT	-	NT	-	NT	-
16	NT	-	89,44	1,12	NT	-	NT	-	NT	-
17	NT	-	90,38	1,10	NT	-	NT	-	NT	-
18	NT	-	91,46	1,09	NT	-	NT	-	NT	-
Média	NT	-	90,67	1,11	NT	-	NT	-	NT	-
Desvio			3,45	0,04						

*

Média	NT	-	89,81	1,14	NT	-	NT	-	NT	-
Desvio	-	-	3,44	0,10	-	-	-	-	-	-

* Média dos dados coletados no período de maio de 2006 a março de 2007 (22 amostras)

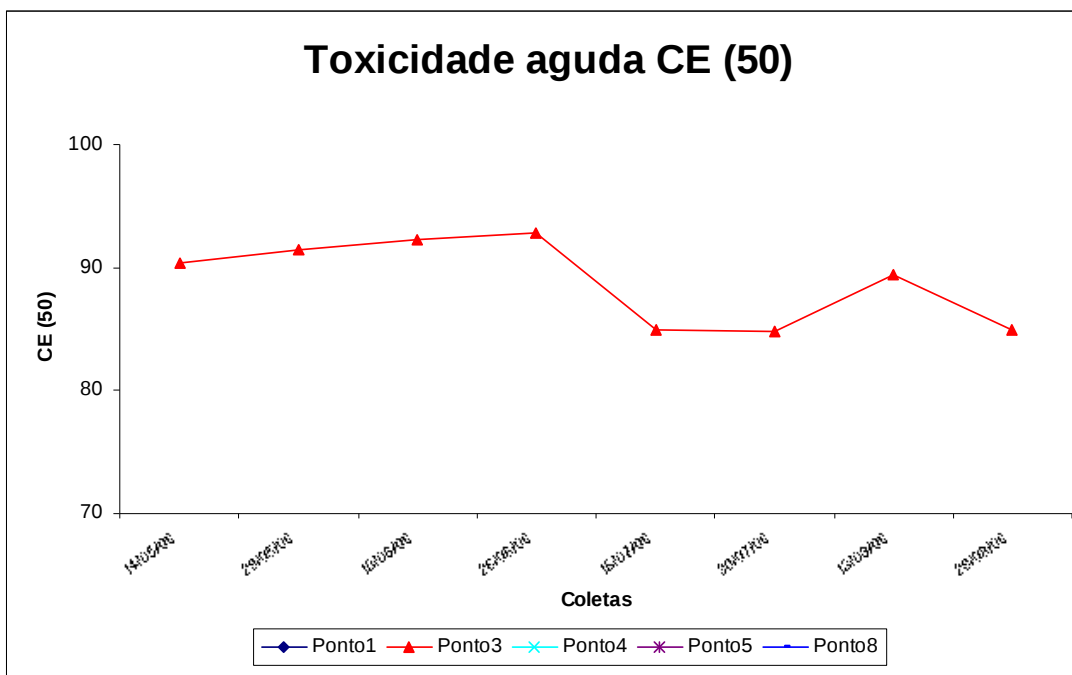


Figura 7. Toxicidade aguda em teste com *Daphnia similis* nas amostras coletadas no Rio Jaguarí, na saída da lagoa de estabilização (P3), Rio Atibaia montante (P4), jusante (P5) e (P8).

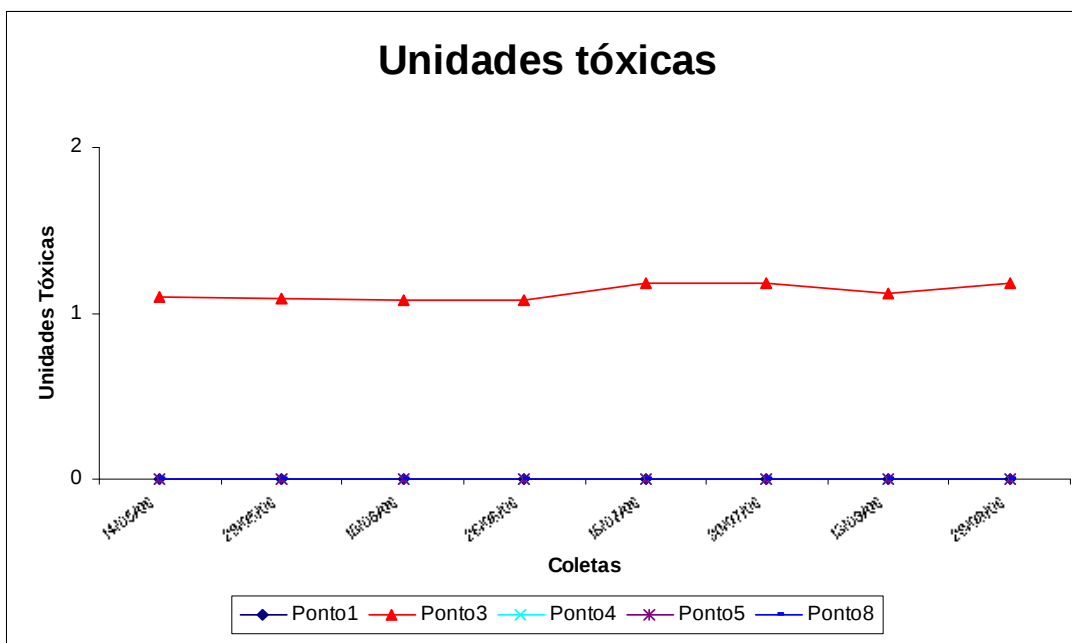


Figura 8. Unidades tóxicas em teste com *Daphnia similis* nas amostras coletadas no Rio Jaguarí (Ponto 1) na saída da lagoa de estabilização (P3), Rio Atibaia montante (P4), jusante (P5) e (P8).

O ensaio biológico de toxicidade aguda empregando *Daphnia similis* indica a importância do tratamento biológico na detoxicação do efluente industrial. A Tab.1 insere os dados dos pontos 1; 3; 4; 5 e 8.

CONCLUSÃO

Considerando-se que o efluente industrial da Replan constitui uma mistura orgânica e inorgânica complexa, associada ao esgoto doméstico, o ensaio biológico com *Daphnia similis* demonstrou uma melhora na toxicidade em UT de 85,09 (média de 18 amostragens). A água residual com 1,11 unidades tóxicas não interfere na toxicidade do Rio Atibaia, pois o Ponto 4 montante à descarga e 5 e 8 jusante não indicam toxicidade.

3.1.2 ENSAIO BIOLÓGICO EMPREGANDO *Ceriodaphnia dubia* – TOXICIDADE CRÔNICA.

Ceriodaphnia dubia é um microcrustáceo (**Figura 9**) empregado para avaliar efeitos tóxicos agudos e crônicos onde se prevê a presença de vida aquática.

Este microcrustáceo é encontrado em água doce de lagos. Em laboratório as criações são empregadas como alimento para a criação de larvas e ainda na indústria para alimentação de peixes ornamentais.

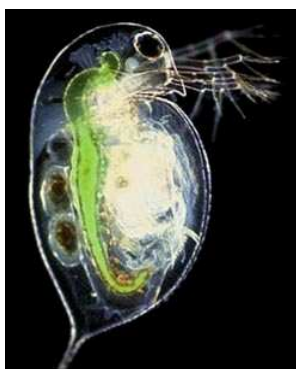


Figura 9 *Ceriodaphnia dubia* espécie utilizada em ensaios de toxicidade crônica.

Para alimentação da *C. dubia* em laboratório os animais recebem como dieta *Pseudokichneriella subcapata*, como recomenda a norma utilizada CETESB L5. 022–nov/1991.

Os ensaios de toxicidade nas amostras coletadas foram acompanhadas em sua toxicidade crônica durante 7 dias e os resultados de 9 análises efetuadas no período de 15/08/07 a 28/04/08 não revelaram toxicidade crônica como mostra a **Tab.2**.

Tabela 2. Determinação de toxicidade crônica mediante o ensaio biológico empregando *Ceriodaphnia dubia*, duração 7 dias, nas amostras coletadas no Rio Jaguarí (P1), montante (P4), jusante (P5) e (P8).

		CE(50)Pontos de coleta				Sensibilidade NaCl g/L
Nº coletas	Data	1	4	5	8	
2	15/08	NT	NT	NT	NT	0,94
4	26/09	NT	NT	NT	NT	0,96
6	24/10	NT	NT	NT	NT	0,95
8	21/11	NT	NT	NT	NT	0,96
10	30/01	NT	NT	NT	NT	0,95
12	06/02	NT	NT	NT	NT	0,96
14	17/02	NT	NT	NT	NT	0,96
16	19/03	NT	NT	NT	NT	0,95
18	28/04	NT	NT	NT	NT	0,96

NT= não tóxica

A toxicidade aguda de *D. similis* dispensa a toxicidade crônica quanto a *C. dubia* razão pela qual não foi efetuado o ensaio com amostras no ponto 3.

Entretanto, pode-se constatar que o efluente industrial tratado oriundo da Replan, não contempla qualquer toxicidade nas águas à montante ou jusante da entrada do ponto 3 no Rio Atibaia.

CONCLUSÃO: As amostras analisadas não apresentaram toxicidade crônica à *Ceriodaphnia dubia* durante o período de 15/08/07 a 28/04/08

3.1.3 DINÂMICA POPULACIONAL DE *Daphnia similis* CRIADAS EM ÁGUAS DO ENTORNO DA REPLAN.

Este estudo foi elaborado no sentido de verificar-se a sensibilidade de *Daphnia similis* quanto à sua capacidade de reprodução nas águas dos pontos de amostragem 1;3;4 e 8 e o controle como sendo água do Ribeirão Claro, coletada junto à estação de captação de água para ser tratada na ETA I de Rio Claro, SP. Esta água não recebe nenhum tipo de esgoto urbano ou industrial.

Objetivou-se avaliar a dinâmica populacional do microcústáceo *D. similis*, nos períodos seco e chuvoso, em três testes de duração de 40 dias cada, em diferentes amostras de água coletadas.

Foram realizados 3 experimentos.

Material e Métodos

As *D. similis* foram mantidas sob as condições padronizadas da Cetesb (1991).

Os microcústáceos foram cultivados na água do Ribeirão Rio Claro, com o pH entre 7,2-7,6 (correção), dureza entre 42-48mg CaCO₃/L e condutividade próxima a 160µS/cm.

Os organismos são mantidos em cristalizadores de 3L que são colocados em estufa incubadora BOD, em temperatura de 20°C. Os microcústáceos são alimentados diariamente com algas *Selenastrum capricornutum* (Figura 10), que recentemente passou a ser denominada de *Pseudokichneriella subcapata* e a água trocada 2 vezes na semana.



Figura 10. Microalga *Selenastrum capricornutum* sinônimo *Pseudokichneriella subcapata*, alimento de *Daphnia similis*

Experimentos.

Os experimentos em triplicata (três réplicas para cada amostra de água) tiveram duração de 40 dias cada (1º Experimento - 17/09/07 à 26/10/07, 2º Experimento – 09/11/07 à 18/12/07 e 3º Experimento - 17/01/08 à 25/02/08), sendo analisado a dinâmica populacional tanto no período seco, como no período de chuvas, que iniciou-se no mês de janeiro/2008.

As *D. similis* foram criadas em béquers de 1L, com 600mL de cada amostra de água, que eram previamente filtradas, para a remoção de material em suspensão. Os bequers foram mantidos em estufa Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), à temperatura de 20° ± 2°C, luminosidade de 1000 LUX e fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas de escuro.

No início do experimento foram adicionados 10 indivíduos neonatos (filhotes) com 24 horas de vida em cada béquer.

Para a manutenção da população de *D. similis* foram realizadas trocas de água dos recipientes de 3 em 3 dias, retirando-se cuidadosamente os microcrustáceos com pipeta Pasteur, recolocando-os sobre a nova amostra de água, que previamente era filtrada (para a retirada de material em suspensão). Diariamente os indivíduos eram alimentados com concentração de 3×10^6 células de *Pseudokichneriella subcapata* /mL por *D. similis*.

Forma de avaliação

O crescimento populacional de determinada espécie é dado, fundamentalmente, pela sua capacidade reprodutiva. Dessa forma, diariamente procedeu-se a contagem direta das matrizes e dos filhotes de cada amostra. Todos os filhotes de cada população foram separados empregando a pipeta Pasteur e armazenados em béquers de 30 e 50 mL.

O estudo também procurou observar prováveis diferenças na dinâmica da população dos microcrustáceos, em função dos períodos seco e chuvoso da região.

Resultados

Primeiro experimento: 17/09/07 à 26/10/07

Tabela 3. Viabilidade do número de matrizes de *Daphnia. similis* durante o Experimento1, acompanhado durante 40 dias em condição padrão (período 17/09/07 a 26/10/07).

DIAS	NÚMERO DE MATRIZES				
	PONTOS DE COLETA				
	CONTROLE	P1	P3	P4	P8
1	30	30	30	30	30
2	29	25	30	30	29
3	29	24	30	30	29
4	28	22	27	28	28
5	28	21	27	28	26
6	28	28	21	27	26
7	27	21	27	27	26
8	27	21	27	27	26
9	27	21	26	26	26
10	27	21	25	26	26
11	27	21	25	26	26
12	27	21	25	26	25
14	27	21	24	26	25
15	27	21	24	26	25
16	27	21	24	26	25
17	26	21	24	26	25
18	26	21	23	26	25
19	26	21	22	26	25
20	26	21	21	26	25
21	26	21	21	25	25
22	26	21	18	25	24
23	25	21	17	24	24
24	24	21	16	24	23
25	23	21	12	23	23
26	23	21	12	23	23
29	22	21	11	23	21
32	21	21	09	21	19
35	20	21	03	21	19
36	20	21	02	20	19
37	20	19	02	20	18
39	20	19	01	19	17
40	19	17	01	18	17

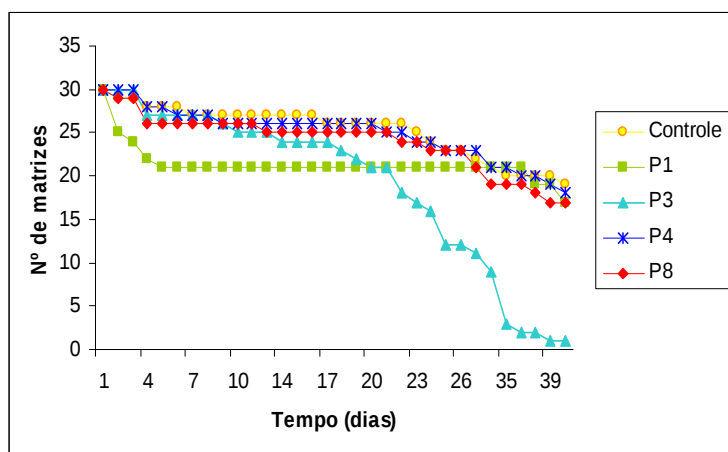


Figura 11. Viabilidade de matrizes de *Daphnia similis* mantidas em condição padrão (controle), nas águas do Rio Jaguari (P1), na saída do efluente da REPLAN (P3), e a montante (P4) e jusante do Rio Atibaia (P8) durante o Experimento1.

Tabela 3 – Somatória do número de filhotes de *Daphnia similis* acompanhada durante 40 dias e mantida em condições padrão nas águas: Rio Jaguarí (P1); saída da lagoa de estabilização (P3); Rio Atibaia montante P4) e jusante (P8), durante o Experimento 1.

DIAS	NÚMERO DE FILHOTES				
	AMOSTRAS				
	Controle	P1	P3	P4	
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	37	37
9	0	20	0	131	91
10	32	99	0	146	131
11	29	84	0	371	274
12	60	120	0	134	166
14	75	180	15	317	345
15	43	124	38	118	90
16	13	57	74	245	260
17	16	197	69	218	290
18	35	70	110	273	318
19	36	107	68	229	274
20	82	99	148	149	89
21	23	29	71	88	121
22	15	34	46	32	119
23	49	62	104	100	159
24	14	23	38	49	41
25	21	39	113	57	75
26	54	27	48	67	129
29	43	110	165	224	216
32	43	110	165	224	216
35	21	102	41	305	266
36	2	12	1	14	10
37	21	7	16	109	65
39	60	41	11	239	90
40	28	38	15	163	109
TOTAL	815	1791	1356	4039	3981

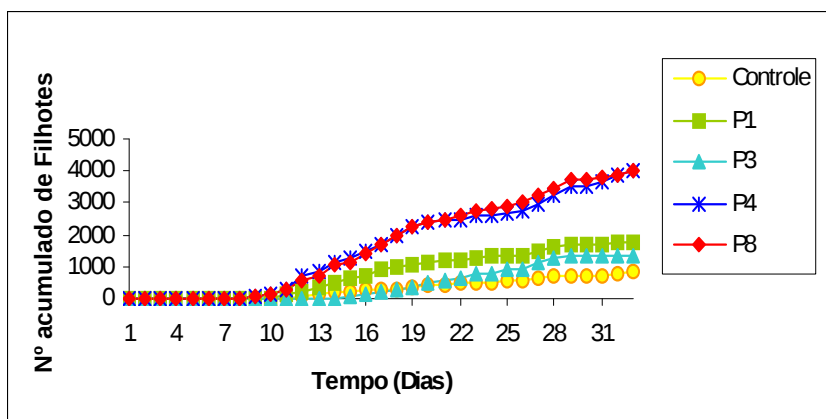


Figura 12. Somatória do número de filhotes de *Daphnia similis* mantida em condição padrão (controle), nas águas do Rio Jaguarí (P1), na saída do efluente da REPLAN (P3), e a montante (P4) e jusante do Rio Atibaia (P8) durante o Experimento 1.

Segundo Experimento (09/11/07 à 18/12/07)

Tabela 5. Viabilidade do número de matrizes de *Daphnia similis* nas águas: Rio Jaguarí (P1); saída da lagoa de estabilização (P3); Rio Atibaia montante P4) e jusante (P8) durante o Experimento 2.

DIAS	NÚMERO DE MATRIZES				
	AMOSTRAS				
	Controle	P1	P3	P4	P8
1	30	30	30	30	30
2	30	30	30	30	30
3	29	30	30	30	30
4	29	30	29	29	30
5	29	30	29	27	30
6	29	29	29	27	30
7	29	29	29	27	29
8	29	29	29	27	29
9	29	29	29	27	29
10	27	29	29	27	29
12	27	29	28	27	28
13	27	29	28	27	27
14	27	29	28	27	27
15	27	28	28	27	27
17	27	28	28	27	27
18	27	28	28	27	27
19	27	28	28	27	26
20	27	28	28	27	26
21	27	28	28	27	26
22	26	27	28	27	26
23	26	27	27	27	26
24	26	26	27	27	26
25	26	26	26	27	26
27	26	26	26	25	26
28	26	23	26	25	25
29	25	23	26	24	25
32	24	22	25	23	24
33	24	22	25	23	23
34	24	22	24	23	23
35	24	22	24	23	23
36	24	22	23	22	22
38	22	21	20	22	22
39	21	20	15	22	22
40	19	20	12	22	21

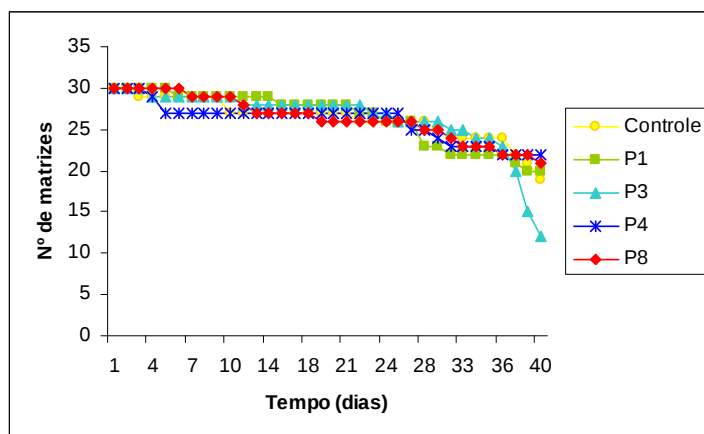


Figura 13. Viabilidade do número de matrizes de *Daphnia. similis* mantidas em condição padrão (controle), nas águas do Rio Jaguarí (P1), na saída do efluente da REPLAN (P3), e a montante (P4) e jusante do Rio Atibaia (P8) durante o Experimento 2.

Tabela 6. Somatória do número de filhotes de *Daphnia similis* mantidos em condições padrão nas águas: Rio Jaguarí (P1); saída da lagoa de estabilização (P3); Rio Atibaia montante P4) e jusante (P8), durante o Experimento 2.

DIAS	NÚMERO DE FILHOTES				
	AMOSTRAS				
	Controle	P1	P3	P4	P8
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	15	0	0	0	0
9	20	24	52	27	36
10	32	80	290	85	169
12	50	159	478	227	259
13	16	19	552	55	61
14	50	97	96	132	106
15	88	15	0	8	12
17	171	54	247	75	62
18	31	3	20	63	36
19	21	36	217	162	81
20	120	118	88	45	16
21	24	31	724	177	169
22	102	107	82	66	44
23	31	13	114	47	69
24	15	9	318	83	78
25	45	106	101	27	50
27	63	24	400	165	202
28	93	51	137	10	155
29	36	12	256	72	67
32	21	29	264	58	83
33	22	123	170	32	53
34	5	28	308	130	90
35	59	43	98	35	42
36	2	105	287	36	86
38	66	66	344	205	223
39	25	32	165	102	93
40	37	15	26	104	113
TOTAL	1260	1399	5834	2228	2455

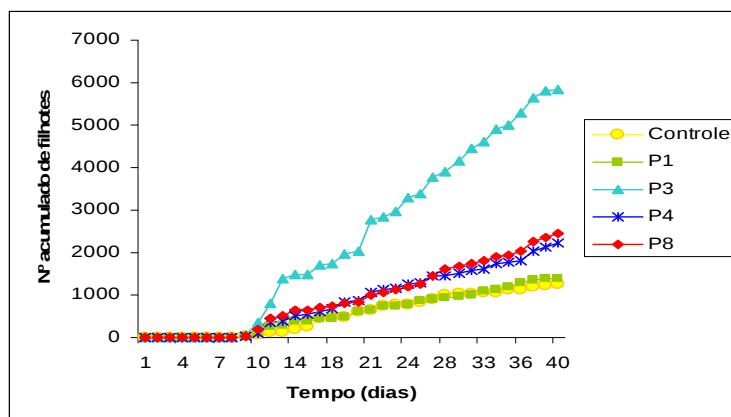


Figura 14. Somatória de filhotes de *Daphnia similis* mantidos em condição padrão (controle), nas águas do Rio Jaguari (P1), na saída do efluente da REPLAN (P3), e a montante (P4) e jusante do Rio Atibaia (P8) durante o Experimento2.

Terceiro Experimento (17/01/08 à 25/02/08)

Neste período mais chuvoso, todas as amostras de água apresentaram valores superiores de turbidez, em relação aos outros experimentos. A chuva provavelmente diluiu as impurezas da água, porém introduz outras substâncias que podem não ser nocivas, pois observou-se que não houve mortalidade acentuada das matrizes durante o experimento.

As *D. similis* do controle e Ponto1;3; 4 e 8 apresentaram declividade do número de matrizes, praticamente homogêneo ao final do teste (Fig.13 e Tabela 7). De acordo com a Figura 15 estas amostras reproduziram o menor número de filhotes (581 neonatas para o controle e 616 para o P1). Oliveira (2005) afirma que o ciclo de reprodução da *D. similis* inicia-se nos primeiros 9 dias de vida e que o número de filhotes acentua-se até 15 dias e mantém-se até aproximadamente os 25 dias. A partir deste período as fêmeas sofrem desgaste pelas gestações seguidas e ocorre declínio na produtividade de filhotes. Com essas considerações, as populações submetidas ao desenvolvimento nas águas dos pontos analisados mostraram-se dentro da normalidade do ciclo da espécie.

Os microcrustáceos da amostra da saída do efluente da refinaria (Ponto3) geraram grande número de filhotes (Tab. 7 e Fig.13), totalizando 4166 neonatas. Os valores de DBO₅ de 23,213 mg/O₂/L, mostram que a amostra continha certa quantidade de matéria orgânica, que propiciou a reprodução, especialmente pela alimentação com a provável diversidade de espécies de microalgas.

Este fato favoreceu a multiplicação da *Daphnia similis*

Tabela 7. Viabilidade do número de matrizes de *Daphnia similis* mantidas em condições padrão nas águas: Rio Jaguarí (P1); saída da lagoa de estabilização (P3); Rio Atibaia montante P4) e jusante (P8), durante o Experimento 3.

DIAS	NÚMERO DE MATRIZES				
	AMOSTRAS				
	Controle	P1	P3	P4	P8
1	30	30	30	30	30
2	30	30	29	29	30
3	30	30	29	29	30
4	30	29	29	27	29
5	29	29	29	27	29
6	27	29	29	27	29
7	27	29	29	27	29
8	27	29	29	27	29
9	26	29	29	27	28
12	26	29	29	27	27
13	26	29	29	26	27
14	26	29	29	26	27
15	26	29	29	26	27
16	25	29	29	26	27
17	25	29	29	26	27
18	25	29	29	26	27
20	25	28	29	26	25
21	24	28	29	26	25
22	24	28	29	26	25
23	24	27	28	26	24
26	24	27	28	26	24
27	23	26	28	26	23
28	23	26	28	26	23
29	21	26	28	26	22
30	21	26	28	25	22
31	21	26	27	25	22
32	21	26	26	25	22
33	21	26	26	24	22
34	21	26	25	24	22
35	21	26	25	24	22
36	20	26	25	24	22
37	20	26	25	24	22
39	19	22	23	24	22
40	19	20	22	23	22

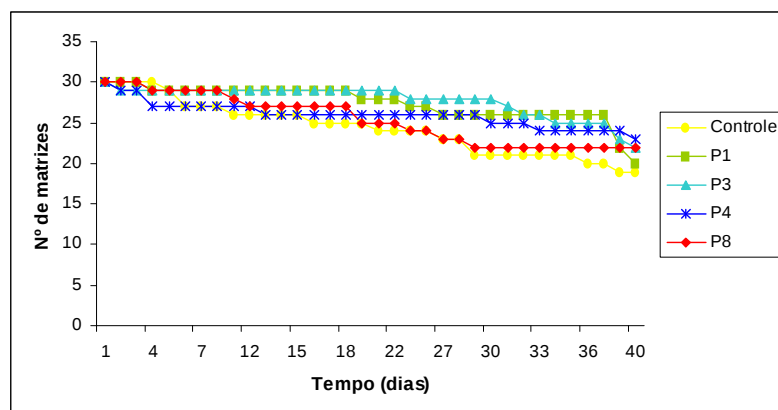


Figura 15. Viabilidade do número de matrizes de *D. similis* mantida em condição padrão (controle), nas águas do Rio Jaguari (P1), na saída do efluente da REPLAN (P3), e a montante (P4) e jusante do Rio Atibaia (P8) durante o Experimento 3.

Tabela 8. Somatória de filhotes de *Daphnia similis* mantidos em condições padrão nas águas: Rio Jaguarí (P1); saída da lagoa de estabilização (P3); Rio Atibaia montante P4) e jusante (P8), durante o Experimento 3.

DIAS	NÚMERO DE NEONATAS				
	AMOSTRAS				
	Controle	P1	P3	P4	P8
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	4	0	0	16	15
9	7	7	45	88	40
12	59	39	341	279	245
13	2	12	69	60	33
14	22	10	307	54	118
15	14	17	125	20	93
16	7	7	290	70	80
17	31	47	180	51	146
18	25	57	151	65	27
20	77	81	444	182	114
21	6	11	254	39	8
22	12	8	114	50	42
23	1	3	133	20	17
26	16	12	227	137	150
27	13	29	64	103	51
28	11	15	173	30	77
29	0	8	273	38	25
30	3	19	121	59	46
31	31	13	356	69	64
32	19	19	43	22	13
33	6	35	63	16	83
34	33	27	165	63	49
35	19	24	21	24	71
36	69	42	20	95	31
37	8	16	67	73	79
39	65	35	62	104	149
40	21	23	58	78	108
TOTAL	581	616	4166	1905	1974

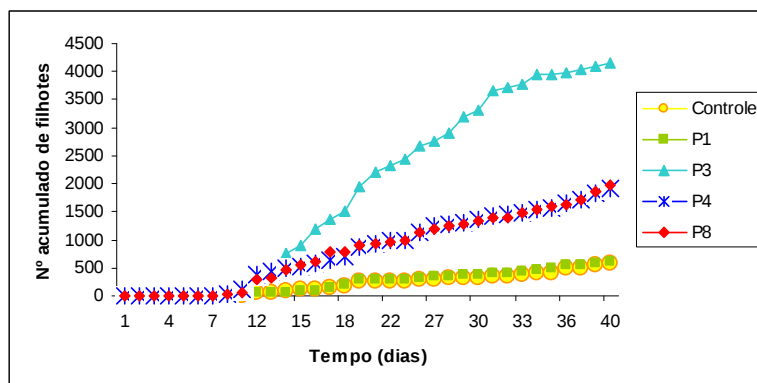


Figura 16. Somatória de filhotes de *Daphnia similis* mantida em condição padrão (controle), nas águas do Rio Jaguarí (P1), na saída do efluente da REPLAN (P3), e a montante (P4) e jusante do Rio Atibaia (P8) durante o Experimento 3.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados as águas dos Rios Ribeirão Rio Claro, Atibaia e Jaguarí não alteraram significativamente a dinâmica populacional das *D. similis*.

Conclui-se que um efluente tratado pode indicar numa análise, que do ponto de vista biológico estimula a reprodução e a sobrevivência. Por outro lado, este trabalho mostra que o efluente tratado da Refinaria não interfere na reprodução da *D. similis* no Rio Atibaia (P4 e P8), local em que é descartado.

Considerando que os microcústáceos representam uma dos mais importantes níveis de ligação da cadeia trófica, é fundamental a adequação das condições ambientais para a continuidade e manutenção da vida de *D. similis*. especialmente para o Rio Atibaia que nos últimos 10 anos vem sofrendo severas perdas da microbiota.

REFERÊNCIAS CITADAS

ANGELIS, D. F. **Estudo das condições físicas, químicas e biológicas do efluente da refinaria de Paulínia – REPLAN e do Rio Atibaia, à montante e jusante, considerando-se a prevenção de danos ambientais.** Relatório Final- Processo 270.3.038.02.0 Contrato REPLAN-FUNDUNESP. 2003.

BARBOSA, R.M. et al. Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI. In: Espíndola, E.L.G. et al. (Ed.). **A toxicidade de efluentes (lodo) de estações de tratamento de água a Dafinídeos (*D. similis*), Quironomídeos (*Chironomus xanthus*) e Peixes (*Hyphessobrycon egues*).** São Carlos, RiMa, 2000. p.379-394.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, 17 de março de 2005.** Brasília, 2005.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, **Água: Teste de Toxicidade aguda com *D. similis* Claus, 1876 (Cladocera Crustácea).** São Paulo, 1991. 33p. Norma Técnica L5 018.

EDMONDSON, W.T. (Ed.) **Fresh-water biology.** New York, John Wiley and Sons, Inc., 1959.

OLIVEIRA, V. J. A. de. **Dinâmica populacional de *D. similis* (crustácea, cladóceras) desenvolvidas nas águas dos Rios Atibaia e Jaguari (Paulínia-SP) e Ribeirão Rio Claro (Rio Claro-SP).** Uniararas: Araras, novembro de 2005.

WIECZOREK, A. **Efeito do Efluente da Refinaria de Petróleo Replan/Petrobras sobre a dinâmica populacional de *D. similis*.** Unesp: Rio Claro, novembro de 2003.

3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DO ENTORNO DA REFINARIA SEGUNDO O TESTE DE AMES

INTRODUÇÃO

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam compostos genotóxicos permitem identificar substâncias com riscos potencial à saúde humana. O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*– Teste de Ames – representa a metodologia de triagem mais utilizada atualmente para detectar substâncias carcinogênicas genotóxicas.

O teste emprega linhagens de *S. typhimurium* auxotróficas para histidina, estas não são capazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem sua capacidade de síntese. Suspensões de células bacterianas são expostas à amostra-teste na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica exógeno, e plaqueadas em meio de cultura mínimo. O número de revertentes é quantificado, pela contagem de colônias que crescem nesse meio de cultura após a exposição de uma população de bactérias à amostra a ser testada.

As linhagens de *S. typhimurium* apresentam características genéticas adicionais, que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos tipos de agentes mutagênicos. As linhagens TA98 e TA100 são comumente utilizadas para estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos.

Os resultados são expressos pelo número de colônias revertentes por placa, ou pela razão de mutagenicidade (RM):

$$RM = \frac{T}{C} \quad \text{onde:}$$

T = número de colônias revertentes na placa-teste

C = número de revertentes na placa-controle

Foram realizados 2 ensaios de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

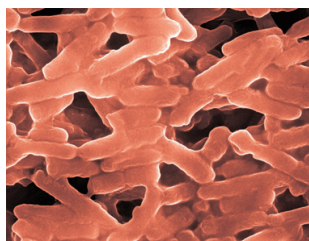


Figura 17. Bactéria *Salmonella typhimurium*, empregada como organismo teste no ensaio de mutagenicidade - AMES

Análise das águas referentes à 10ª coleta 12/12/07 (1ª. etapa)

O resultado é considerado positivo quando o número de colônias revertentes induzidas é igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo, ou seja, quando apresentar índice de mutagenicidade maior ou igual a 2 para a dose testada.

As amostras empregadas no teste de mutagenicidade foram preparadas pela concentração de 2.000mL de amostra, para cada ponto de coleta, mediante adsorção de compostos orgânicos em fase sólida, empregando resina C18. Foram testados 133,00mL equivalente de amostra por placa-teste, empregando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente.

Para os três pontos de coleta P3, P4 e P8 respectivamente saída do efluente tratado, montante e jusante da entrada do efluente no Rio Atibaia, as amostras testadas não apresentam índices de mutagenicidade ($RM < 2$).

A não observação de efeitos mutagênicos neste teste não descarta a possibilidade de sua existência, devem ser considerados efeitos relativos a variações sazonais na concentração dos poluentes, nos pontos de amostragem, assim como, emprego de outros tipos de matriz para adsorção/concentração das amostras ou, adição de maior volume equivalente de amostra por placa-teste.

Tabela 9. Contagem do número de colônias revertentes dos controles negativo e positivo, sob presença e ausências de ativação metabólica, para as linhagens de *S. typhimurium* empregadas no Teste de Ames.

TA 98 sem ativação	Placa1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Média	Desvio padrão
Controle negativo	23	17	16	19	21	19,2	2,86
Controle positivo	1100	10000				1050	70,71
TA 98 com ativação							
Controle negativo	13	14	15	16		14,25	0,96
Controle positivo	950	930				940	14,14
TA 100 sem ativação							
Controle negativo	110	103	118	124	133	117,60	11,72
Controle positivo	320	1200				1260	84,85
TA 100 com ativação							
Controle negativo	92	100	106	97	126	104,2	13,20
Controle positivo	1100	870				985	162,63

Tabela 10. Contagem do número de colônias revertentes dos controles negativo e positivo, sob presença e ausências de ativação metabólica, para as linhagens de *S. typhimurium* empregadas no Teste de Ames.

TA 98 sem ativação	Placa1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	RM
P3	19	23	20	20,67	2,08	1,08
P4	14	16	18	16,00	2,00	0,83
P8	15	14	21	16,67	3,79	0,87
TA 98 com ativação						
P3	15	12	15	14,00	1,73	0,98
P4	13	13	13	13,00	0,00	0,91
P8	13	12	12	12,33	0,58	0,87
TA 100 sem ativação						
P3	83	93	100	92,00	8,54	0,78
P4	116	124	101	113,67	11,68	0,97
P8	114	120	104	116,00	8,08	0,96
TA 100 com ativação						
P3	107	100	96	101,00	5,57	0,97
P4	107	140	127	124,67	16,62	1,20
P8	105	120	123	116,00	9,64	1,11

Estamos incluindo neste relatório dados de uma coleta realizada no período de inverno do ano de 2008 apenas para uma abordagem comparativa, como segue:

Análise das águas referentes à 7ª coleta 13/08/08 (2ª etapa do convênio).

Tabela 11. Contagem do número de colônias revertentes dos controles negativo e positivo, sob presença e ausências de ativação metabólica, para as linhagens de *S. typhimurium* empregadas no Teste de Ames.

TA 98 sem ativação	Placa1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão
Controle negativo	25	25	26	25,33	0,58
Controle positivo	1121	1430	1431	1327,33	178,69
TA 98 com ativação					
Controle negativo	31	38	34	34,33	3,51
Controle positivo	1148	1105	910	1054,33	126,83
TA 100 sem ativação					
Controle negativo	215	223	215	217,67	4,62
Controle positivo	>6500	>6500	>6500	>6500	0,00
TA 100 com ativação					
Controle negativo	223	225	205	217,67	11,02
Controle positivo	>6500	>6500	>6500	>6500	0,00

Tabela 12. Contagem do número de colônias revertentes nas placas teste, sob presença e ausências de ativação metabólica, para as linhagens de *S. typhimurium*.

	Placa1	Placa 2	Placa 3	Média	Desvio padrão	RM
P3	30	25	29	28,00	2,65	1,10
P4	32	20	27	26,33	6,03	1,01
P8	33	29	30	30,67	2,08	1,21
TA 98 com ativação						
P3	34	31	32	32,33	1,53	0,94
P4	30	29	19	26,00	6,08	0,75
P8	29	31	29	29,67	1,15	0,86
TA 100 sem ativação						
P3	215	223	215	217,67	4,62	1,00
P4	302	290	331	307,67	21,08	1,42
P8	330	303	310	314,33	14,01	1,45
TA 100 com ativação						
P3	223	225	205	217,67	11,02	1,00
P4	253	251	248	227,67	24,11	1,05
P8	251	233	269	251,00	18,00	1,16

CONCLUSÃO: De acordo com a metodologia empregada (CETESB L5. 621, 1994) e resultados obtidos o efluente da Replan (Ponto 3, bem como os pontos 4 e 8) não apresentou potenciais mutagênicos para as cepas de *Salmonella typhimurium* nas duas coletas realizadas. (período chuvoso e período de estiagem)

REFERÊNCIAS

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE CARCINOGÊNESE E TERATOGENESE AMBIENTAL. Disponível em: < <http://www.sbmcta.org.br> > acesso em 23 de março de 2008.

Ribeiro, L. R. et al. **Mutagenese ambiental**. 1º ed. Canoas: Ulbra, 2003.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – Teste de Ames** – L5.620. São Paulo, 38p. 1993.

3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DOS EFLUENTES DA REPLAN DAS ÁGUAS DO SEU ENTORNO, POR MEIO DE DOIS SISTEMAS.

3.3.1 Introdução

O ambiente aquático tem sido o destino final de vários tipos de efluentes industriais. Devido ao possível potencial mutagênico e carcinogênico dos químicos contidos nestes efluentes, eles têm sido foco de estudo por pesquisadores preocupados com a poluição marinha e de água doce (PAIN, 1995; JOHNSON, 1998; ALZIEU, 2000; GODWIN, 2001).

A toxicologia estuda a ação de químicos e xenobióticos sobre os organismos, com ênfase especial nos efeitos danosos (RAND e PETROCELLI, 1985). A genética toxicológica tem por finalidade identificar e analisar a ação destes agentes em relação a sua capacidade de interagir com o material genético dos organismos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O uso de bioensaios é eficiente para a identificação de toxicidade e mutagenicidade de diversos agentes. Uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para se realizar estudos de avaliação de mutagenicidade é o teste de Aberrações Cromossômicas (AC). Esse teste é um dos poucos métodos diretos capazes de mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002).

Bioensaios com plantas têm sido considerados suficientemente sensíveis e simples. Estes organismos-teste têm sido validados por instituições internacionais como a *United Nations Environmental Program* (UNEP), *World Health Organization* (WHO) e *US Environmental Protection Agency* (USEPA), que provaram a eficiência destes organismos para o monitoramento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por poluentes ambientais (MENKE et al., 2001; GRANT, 1999). Dentre as espécies utilizadas, a espécie *Allium cepa* (cebola) tem sido amplamente utilizada para a determinação dos efeitos citotóxico, mutagênico e genotóxico de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2004), sendo utilizada como um organismo padrão de diversos testes de curta duração (SMAKA-KINCL et al., 1996), por apresentar boa correlação com

outros sistemas-teste, incluindo os de mamíferos (GRANT, 1982; RANK e NIELSEN, 1993; CHAUHAN et al., 1999).

Segundo Powers (1989), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial de perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental.

De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) é um excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais realizados com o objetivo de investigar a toxicidade dos contaminantes presentes em ecossistemas aquáticos.

Os eritrócitos de peixes são bastante utilizados para avaliar o potencial mutagênico de poluentes ambientais por meio do teste do micronúcleo (MN). MN são porções de cromatina intracitoplasmáticas que podem ser resultantes de quebras cromossômicas ou de perda de cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular (KIRSCH-VOLDERS et al., 2000).

Segundo Pérez et al. (2001) e Silva et al. (2003), grande número de HPAs são considerados, além de carcinógenos, agentes oxidativo. De acordo com Mello et al. (2001) esse tipo de agente químico pode levar a comprometimentos da fisiologia celular, desencadeada por uma seqüência complexa de eventos que pode resultar em morte celular. Corantes Fluorescentes como o Hoescht 33342, o iodeto de propídio, o brometo de etídeo e o acridine orange são utilizados para avaliar a integridade da membrana celular e, conseqüentemente, a viabilidade da célula. Esses corantes promovem colorações diferenciadas entre as células vivas e as em processo de morte celular. Essa técnica é de aplicação *in vivo* e pode ser adaptada para diferentes organismos e tipos celulares, sendo útil para a avaliação de citotoxicidade causada por diferentes poluentes ambientais.

3.3.2 Objetivos

O presente projeto teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos efluentes da refinaria de petróleo (REPLAN- Paulínia-SP), por meio das técnicas de **Aberrações Cromossômicas** (AC) e de Corantes Vitais em sistema-teste de *Allium cepa* e do teste do **Micronúcleo** (MN) e **Anormalidades Nucleares** (AN) em sistema-teste de *Oreochromis niloticus*.

3.3.3. Material

Para os testes de Aberrações Cromossômicas (AC) e Corantes Vitais utilizou-se como organismo-teste sementes da espécie de *Allium cepa* (cebola, variedade baia periforme) Para a realização do teste do para o teste de Micronúcleo (MN) e Anormalidades Nucleares (NA) utilizou-se como organismo-teste espécimes de *Oreochromis niloticus* (tilápia).

Locais de coleta

As coletas estudadas neste trabalho foram realizadas em setembro, novembro de 2007, e abril de 2008, em oito pontos pré-estabelecidos, relacionados e representados abaixo (Figura):

- P1: Capacitação da água pela REPLAN no Rio Jaguari;
- P3: Saída da lagoa de estabilização no Rio Atibaia;
- P4: Água do Rio Atibaia – montante, 200 metros do descarte do efluente industrial tratado;
- P5: Rio Atibaia – jusante, cerca de 200 metros abaixo da descarga do efluente industrial tratado proveniente da LE;
- P8: Cerca de 500m de descarga do efluente industrial tratado

3.3.4. Métodos

3.3.4.1. Sistema-teste de *Allium cepa*

Teste de Aberrações Cromossômicas

Sementes de cebola, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram submetidas à germinação nas diferentes amostras de águas coletadas em setembro de 2007, sendo utilizada uma placa de Petri para cada tratamento. Água ultrapura foi usada para o teste controle negativo (CN), e 10µg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) para o controle positivo (CP). Quando as radículas atingiram cerca de 2.0 cm de comprimento, foram coletadas e fixadas em ácido álcool-acético (3:1-v/v) por 24h e, posteriormente, submetidas à coloração em reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas do

teste de AC, 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.

Para a análise das AC, diferentes tipos de aberrações foram considerados (perdas, fragmentos, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). No entanto, para a avaliação das AC como um único *endpoint* todas as diferentes aberrações foram reunidas em um só grupo. A análise de MN, nestas células, foi considerada como outro parâmetro de avaliação, não sendo agrupada junto com as AC. O Índice mitótico (IM), relacionado com o 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 ponto de coleta, sendo 1000 células por lâmina para um total de 5 lâminas. Análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, comparando os resultados dos pontos de coleta com controle negativo, a 0,05 de nível de significância.

3.3.4.2. Sistema-teste de *Oreochromis niloticus*

Justificativa

“Quanto à deliberação PCJ 58/06 – que solicita a determinação de micronúcleos e ensaio do teste cometa de peixes de hábitos preferencialmente bentônicos coletados no próprio ambiente”.

Quanto a esta recomendação justificamos no caso da Replan o seguinte:

- O segmento do Rio Atibaia onde são coletadas as amostras atingem menos que 1km, sendo estas coletadas à montante e à jusante da entrada do efluente tratado, portanto, é um segmento de trânsito de peixes e não de permanência.
- Como os peixes têm hábitos migratórios e o segmento do rio é pequeno, os peixes que estão à montante ou jusante envolvidos por esgotos urbanos, tratados ou não e efluentes

industriais provenientes da área química são submetidos a tais variáveis. Portanto, julgamos inoportuno trabalhar com esta biota, por considerá-la não representativa da realidade. Contudo, optou-se colocar peixes saudáveis provenientes de laboratório nas condições do rio e submetê-los às variações químicas da água e do efluente tratado para proceder as análises.

Bioensaio *ex situ*

Espécimes de *Oreochromis niloticus* foram transferidos do tanque de criação de peixes, localizado no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP – campus de Rio Claro, para o Laboratório de Toxicidade de Águas, do mesmo Instituto, onde foram aclimatados a 23°C, com sistema de filtragem e aeração. Posteriormente, para cada bioensaio realizado, os espécimes foram separados, aleatoriamente, em 9 grupos. Os grupos experimentais com 5 peixes cada foram dispostos em 9 aquários contendo 15L cada, sendo 1 para o controle negativo (CN), realizado com água de poço artesiano, e os demais para as amostras dos pontos de coleta de setembro de 2007.

Após completar 72 horas de tratamento, foram coletadas amostras de sangue de todos os indivíduos por meio de punção cardíaca, utilizando seringas descartáveis do tipo insulina (1mL), previamente lavadas com heparina.

Bioensaio *in situ*: Teste do Micronúcleo e Anormalidades Nucleares

Quatorze espécimes de *O. niloticus*, provenientes do tanque de criação de peixes, localizado no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro, foram divididos igualmente em duas gaiolas (Figura 18) e colocados no rio Atibaia, no mês de abril de 2008, nos locais correspondentes aos pontos P4 e P5. Após 72 horas de exposição, as gaiolas foram recolhidas para a retirada das amostras de sangue, por punção cardíaca, dos espécimes de *O. niloticus*.



Figura 18. Os peixes colocados em gaiolas nos pontos montante (Ponto 4) e no ponto jusante (Ponto 8).

O controle negativo referente a este bioensaio foi realizado em laboratório devido à necessidade de uma água isenta de contaminantes.

A confecção das lâminas foi feita por meio da técnica de esfregaços (extensões sanguíneas), sendo a primeira gota descartada com a finalidade de evitar contaminação do material. Foram realizadas duas extensões sanguíneas para cada espécime de *Oreochromis niloticus*. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e, após 24 horas, submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N a 60°C, por 11 minutos. Imediatamente após a hidrólise, as lâminas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff por duas horas.

Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe, nos quais foram determinadas as frequências de células micronucleadas e portadoras de AN, segundo descrição de Carrasco et al. (1990). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, comparando os resultados dos experimentos com as águas dos pontos de coleta com o controle negativo, a 0,05 de nível de significância.

3.3.5. Resultados e discussão

Sistema-teste de *Allium cepa*

Teste de Aberrações Cromossômicas

Os resultados obtidos para o teste de AC, usando o sistema-teste de *Allium cepa*, estão apresentados abaixo nas **Tabelas 13 e 14** dos meses de setembro/2007 e abril/2008.

Tabela 13. Comparação das frequências de IM, AC e MN observadas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* expostas às águas dos pontos de coleta da REPLAN.

Amostra	Pontos de coleta	IM	AC	MN
Setembro 2007	CN	710.11±98.61	3.33±2.05	1.38±2.1812
	CP	660.74±141.80	24.72±17.11	79.07±65.00*
	P1	809.00±27.46	7.05±0.75	0.00±0.00
	P3	702.57±68.00	4.30±1.14	0.00±0.00
	P4	739.65±26.36	8.70±6.50	0.00±0.00
	P5	658.61±47.48	10.50±5.10	1.18±1.77
	P8	706.58±179.87	5.17±3.60	0.96±1.20

5000 células analisadas por tratamento. Média±DP.

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

As frequências de AC e MN observadas nas células meristemáticas expostas às amostras de água coletadas em setembro de 2007, em geral, mostraram-se superiores às encontradas para o controle negativo. No entanto, nenhuma das frequências observadas foi significativa estatisticamente.

A análise do IM mostrou inibição do mesmo para os tratamentos realizados com as amostras de água dos pontos 1; 3 e 4. Foi observado valor significativo de AC para o tratamento realizado com a amostra de água do ponto 1, enquanto que valores significativos de MN foram detectados para as amostras de água dos pontos 1; 3; 4 e 5.

Os resultados obtidos pelo teste de *A. cepa* com as amostras coletadas em abril de 2008 (Tabela 14) indicaram uma inibição do IM para as amostras de água dos pontos 1, 3 e 4 uma ação genotóxica para a amostra de água do ponto 1 e uma ação mutagênica para as amostras de água dos pontos 1, 3, 4 e 5. Os resultados referentes aos pontos 1 e 4 não estão relacionados com as atividades da refinaria. O ponto 1 do Rio Jaguari corresponde ao local onde a refinaria coleta a água para seu uso interno. O ponto 4 envolve a coleta à montante do despejo do efluente tratado da REPLAN no rio Atibaia, especificamente localizado a

200 metros antes do descarte das águas industriais. Logo, os efeitos observados para estas amostras, provavelmente, são derivados de outras atividades industriais, já que esta região é conhecida por concentrar uma alta diversidade de empresas. Desta forma, a mutagenicidade detectada nas amostras do ponto 3 pode também ser em decorrência da utilização das águas do ponto 1, devido a interferência de outros poluentes, que podem estar resultando em uma resposta biológica sinérgica. Os resultados observados para o ponto 5 pode estar relacionado também com a contaminação observada à montante do rio Atibaia.

Tabela 14. Comparação das frequências de IM, AC e MN observadas em células meristemáticas** de raízes de *A. cepa* expostas às águas dos pontos de coleta da REPLAN.

Amostra	Pontos de coleta	IM	AC	MN
Abril de 2008	CN	58.87±11.37	3.18±1.75	0.20±0.62
	CP	59.42±17.62	7.97±5.81*	36.29±27.65*
	P1	36.01±18.32*	7.89±5.32*	3.27±3.77*
	P3	43.51±11.85*	2.30±1.51	1.77±2.35*
	P4	45.89±8.78*	1.19±1.79	2.13±0.96*
	P5	55.53±8.07	1.42±1.20	3.03±2.75*
	P8	59.61±7.86	3.61±2.92	0.81±1.96

*diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney.

** 5000 células analisadas por tratamento. Média±DP.

Sistema-teste de *Oreochromis niloticus*



Figura 19. *Oreochromis niloticus*, a tilápia do Nilo.

Teste do Micronúcleo: bioensaio ex situ

Os resultados obtidos para o teste do MN e Anormalidades Nucleares (AN) em sistema-teste de *Oreochromis niloticus* estão apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Comparação das frequências MN e Anormalidades Nucleares (NA) observadas em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às águas dos pontos de coleta da REPLAN.

Amostra	Pontos de coleta	MN	AN
Setembro 2007	CN	0.00±0.00	6.40±13.22
	P1	0.50±0.57	18.00±23.42
	P3	1.00±1.15	71.50±60.00
	P4	0.60±1.00	80.80±56.00**
	P5	1.66±2.08	59.33±42.47
	P8	1.40±1.00	55.40±15.53

5000 células analisadas por tratamento. Média±DP.

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

As frequências de MN observadas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos às amostras de água coletadas em setembro de 2007, em geral, mostraram-se superiores às encontradas para o controle negativo, porém, nenhuma foi significativa estatisticamente. Já para as frequências de AN observadas para estes mesmos tratamentos, apenas o teste realizado com a amostra de água do ponto 4 apresentou resultado significativo quando comparado com o controle negativo. Este resultado indica que a água do rio Atibaia, no período da coleta, apresentou problemas antes da confluência com o efluente da REPLAN. Desta forma, ressaltamos que o efeito observado não está relacionado com as atividades da REPLAN, pois o ponto 4 corresponde a um local que dista 200 m a montante do rio, logo antes do descarte das águas industriais. Os resultados obtidos não evidenciaram ação mutagênica sobre o sistema-teste de *Oreochromis niloticus* para as amostras de água da área de influência da REPLAN, para o período de setembro de 2007.

Na Tabela 16 estão os resultados da coleta de abril de 2008.

Tabela 16. Comparação das frequências MN e AN observadas em eritrócitos de *O. niloticus* expostos às águas dos pontos de coleta da REPLAN no bioensaio *ex situ*.

Amostra	Pontos de coleta	MN	AN
Abril de 2008	CN	1.00±2.00	129.57±175.11
	P1	0.20±0.45	128.79±203.27
	P3	1.98±3.96	43.02±53.95
	P4	0.96±1.10	119.99±59.15
	P5	0.97±1.18	43.46±30.80
	P8	1.58±2.05	65.38±35.03

5000 células analisadas por tratamento. Média±DP.

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

---- morte dos exemplares

Na Tabela 17 estão os resultados do ensaio *in situ*.

Tabela 17. Comparação das frequências MN e AN observadas em eritrócitos de *O. niloticus* expostos às águas dos pontos de coleta da REPLAN no bioensaio *in situ*.

Amostra	Pontos de coleta	MN	AN
Abril de 2008	CN	0.20±0.44	71.53±50.41
	P4	0.20±0.44	99.00±59.42
	P5	1.71±2.34	52.385±21.60

5000 células analisadas por tratamento. Média±DP.

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

Dos resultados obtidos, observamos que, em ambos os bioensaios realizados, algumas das frequências de MN e AN observadas nos eritrócitos de *O. niloticus* expostos às amostras de água coletadas em abril de 2008, mostraram-se superiores às encontradas para o controle negativo, porém, sem diferenças significativas estatisticamente.

Como mencionado para o sistema-teste de *A. cepa*, este efeito pode não ser decorrente apenas das atividades da refinaria e sim da interferência de outros contaminantes, uma vez

que foi utilizada uma água previamente contaminada (as águas do ponto 1) por outras fontes emissoras.

É importante ressaltar que após o tratamento biológico do efluente da Replan que em parte é proveniente da água do Rio Jaguari, a água encontra-se com ausência de substâncias tóxicas para este parâmetro.

3.3.6 Conclusão

Da análise dos resultados obtidos, conclui-se que os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos induzidos sobre o sistema-teste de *A. cepa* por algumas das amostras de água, coletas em abril de 2008, na área de influência da REPLAN, pode não estar, exclusivamente, relacionadas com as atividades da refinaria, uma vez que estes mesmos efeitos foram observados para a amostra de água do ponto 1, que corresponde a água de captação no rio Jaguari pela REPLAN. Desta forma, devido à alta industrialização da região, outras fontes emissoras podem estar contribuindo para a indução destes efeitos deletérios. Além disso, a citotoxicidade e mutagenicidade detectada para o ponto 4, também reforça a hipótese que outras fontes poluidoras podem estar contribuindo para a indução destes efeitos, pois este ponto corresponde a montante do rio Atibaia, cerca de 200 metros antes do descarte das águas industriais da REPLAN.

Para o sistema-teste de *O. niloticus*, não foi observada mutagenicidade em nenhum dos bioensaios realizados, referentes ao período de abril de 2008. Pela análise dos resultados obtidos, conclui-se que as amostras de água dos pontos de coleta na área de influência da REPLAN, para setembro de 2007, não mostraram potencial genotóxico e mutagênico sobre os sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*.

Pode-se concluir que o sistema de tratamento de efluentes adotado pela empresa está sendo eficiente para assegurar a integridade do meio ambiente, principalmente dos ecossistemas aquáticos, que são destino final de seus efluentes.

3.3.7 Referências citadas

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

ALVES-COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes em água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabariscus* e *Oreochromis niloticus***. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ALZIEU, C., Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, v. 258, p. 99-102. 2000.

CARRASCO, R.K.; TILBURY, K.L.; MYERS, M. Assessment of piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.2123-2136, 1990.

CHAUHAN, L. K. S.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, [S.l.], v. 42, p. 181-9. 1999.

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

GODWIN, A. H., The biological chemistry of lead. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 223-227, 2001.

GRANT, W. F., Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99. p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v. 426, p. 107-112. 1999.

JOHNSON, F. M., The genetic effects on environmental lead. **Mutation Research**, v. 410, p. 123-140, 1998.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potencial evaluation of the water river that receives effluents using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 399-408. 2004.

MENKE, M.; CHEN, I. P.; ANGELIS, K. J.; SCHUBERT, I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. **Mutation Research**, v. 493, p. 87-93. 2001.

PAIN, D. J., Lead in the environment. In: Hoffman D. J. et al. (eds) **Handbook of Ecotoxicology**, Lewis, Boca Raton, Chap 16, 1995.

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

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R., (Ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, **Chemosphere**, p. 1-28, 1985.

RANK, J., LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazine, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 136, p. 13-18. 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53. 1993.

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.

3.4 EFEITO MUTAGÊNICO EM CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS – CHO-K1

3.4.1. Introdução

Sistemas de células de mamíferos em cultura são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos ambientais em testes de curta duração (KURODA et al., 1992). Estes procedimentos estão sendo cada vez mais empregados para identificar não só agentes mutagênicos/antimutagênicos, como também o potencial carcinogênico/anticarcinogênicos de compostos químicos e, são muito indicados devido às facilidades de administração das doses e manutenção (BROCKMAN et al., 1992).

O sistema-teste de cultura de células apresenta várias vantagens, pois apresenta facilidade de padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional) devido à uniformidade metabólica e comportamental do material; possibilidade dos tratamentos das células serem realizados em várias fases do ciclo celular; rapidez; economia; boa reprodutividade; organização dos cromossomos e de seu DNA igual às células *in vivo* (RABELLO - GAY et al., 1991).



FIGURA 20. Hamster – animal mamífero doador de células.

3.4.2 Objetivo

Investigar o possível efeito mutagênico das amostras de água do entorno da Refinaria REPLAN, por meio da análise das células de CHO-K1.

3.4.3 Material e métodos

Linhagem celular e condições de cultura

Para a realização do ensaio de mutagenicidade foram utilizadas células selvagens de ovário de hamster chinês (CHO-K1) fornecidas pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) em março de 2007. O cultivo foi realizado em frascos de cultura (25cm²) na forma de monocamada, em meio D-MEM/HAM F12, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica. Os frascos foram mantidos em estufa de BOD à temperatura de 37°C. Nestas condições o ciclo celular é de 12 horas.

Estabilização das culturas de CHO-K1

Antes da realização dos tratamentos os frascos de cultura de CHO-K1 foram estabilizados em estufa de BOD, à 37°C por um período de 48 horas o que totaliza 04 (quatro) ciclos celulares de CHO-K1.

Tratamento Realizado

Para os tratamentos, foi preparado meio de cultura concentrado (estoque), para ser diluído com as águas coletadas na proporção de 3:1. As amostras de água de cada ponto foram adicionadas ao meio de cultura concentrado no momento do tratamento.

As células CHO-K1, após 48 horas de cultivo em meio normal (período de estabilização), foram mantidas por 2 horas a 37°C, na mistura de meio e água coletada, cujo pH foi ajustado para 7.2 antes do tratamento. O controle positivo (CP) foi tratado com metilmetanosulfonato (MMS) na concentração 10⁻⁴M e o controle negativo (CN) apenas em meio de cultura. Após o tratamento, foi realizado lavagem com tampão PBS (solução tampão fosfato) e mantidas em citocalasina B por 18 horas para induzir a formação de células binucleadas.

Colheita de micronúcleo para células de CHO-K1

Após o término de 18 horas em citocalasina B todos os frascos de culturas de CHO-K1 tiveram seus respectivos meios de cultura reservado em tubo de centrífuga. Em seguida, lavaram-se os frascos 02 (duas) vezes com 5mL de PBS em temperatura ambiente. Após a remoção do PBS adicionou-se 0,5mL de tripsina 0,0025% para promover o desprendimento da monocamada de células. Posteriormente houve a inativação da tripsina com o meio reservado de cada frasco e adição de 01(uma) gota de formol. Homogeneizou-se e centrifugou-se (1250 rpm por 5 minutos). Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se

1,5mL de citrato de sódio. Homogeneizou-se e centrifugou-se (1250 rpm por 5 minutos). Desprezou-se o sobrenadante, suspendeu-se as células e adicionou-se 5mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético) homogeneizando-se rapidamente seguido de centrifugação (1250 rpm por 5 minutos). Retirou-se o fixador até a obtenção da diluição celular desejada.

Preparo de lâmina de célula de CHO-K1

As lâminas foram montadas, coradas com Giemsa e armazenadas em geladeira para posteriormente serem analisadas em microscópio de luz.

Pontos de amostragem

- P1: Água de capacitação pela REPLAN – Rio Jaguari;
- P3: Saída da lagoa de estabilização (água destinada aos despejos no Rio Atibaia, município de Paulínia-SP);
- P4: Água do Rio Atibaia – montante, 200 metros do descarte das águas industriais;
- P5: Água do Rio Atibaia – jusante, cerca de 300 metros abaixo da descarga do efluente industrial tratado proveniente da LE;
- P8: Jusante 500m da descarga do efluente industrial tratado no Rio Atibaia.

Foram efetuadas duas coletas para análise de células de mamíferos: Hamster CHO-K1, em novembro/2007 e janeiro/2008

3.4.4. Resultados

Experimento 1:

Os resultados demonstram que todos os pontos de coletas apresentaram índice de células binucleadas com micronúcleo superior ao controle negativo (0.2%), porém inferiores ao controle positivo (2,7%)

Os pontos 3 (0,75%) e 5 (0,9%) foram os que apresentaram as maiores frequências de células com micronúcleo, porém os valores não foram estatisticamente significativos.

Tabela 18. Frequência de células binucleadas com micronúcleo de CHO-K1 tratadas com as amostras de água da refinaria REPLAN coletadas em novembro de 2007.

Pontos de coleta	Frequência de células binucleadas com micronúcleo (%)
Controle negativo (CN)	0.2
Controle positivo (CP)	2.7*
Ponto 1	0.5
Ponto 3	0.75
Ponto 4	0.35
Ponto 5	0.9
Ponto 8	0.4

* Diferença significativa no nível de significância de 5% pelo teste do Qui-quadrado, em relação ao controle negativo.

Os pontos CN (controle negativo) e CP (controle positivo) são os dados de referência de credibilidade do ensaio.

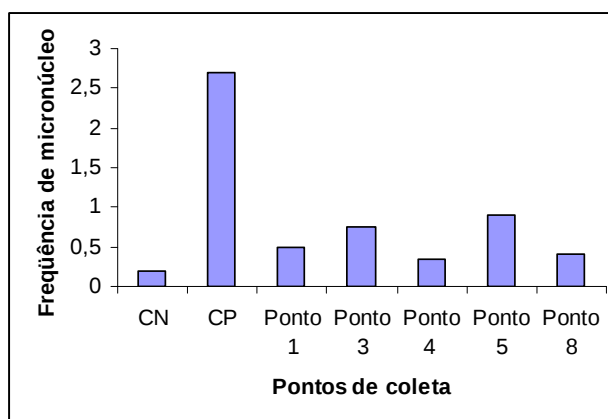


Figura 21. Frequência de células binucleadas com micronúcleo de CHO-K1 tratadas com as amostras de água da refinaria REPLAN.

Os pontos 3 (0,75%) e 5 (0,9%) foram os que apresentaram as maiores frequências de células com micronúcleo (Tabela 18, Figura 21), porém os valores não foram estatisticamente significativos.

O ponto 5 apresentou a maior frequência de células binucleadas com micronúcleo (Tabela 18 e Figura 21), e o ponto 3, a menor frequência de células com micronúcleo (0.4), porém os valores não foram estatisticamente significativos.

As análises de mutagenicidade com células binucleadas com micronúcleo revelam que todas as amostras não apresentaram danos mutagênicos significativos nas células de CHO-K1. Nossos dados sugerem ausência ou presença em baixas concentrações, nas amostras de água coletadas, de substâncias que promovem danos mutagênicos nas células de CHO-K1.

Tabela 19. Frequência de células binucleadas com micronúcleo, de CHO-K1 tratadas com as amostras de água da refinaria REPLAN, coletadas em janeiro/2008

Pontos de coleta	Frequência de células binucleadas
Controle negativo	0.5
Controle positivo	3.1*
Ponto 1	1.6
Ponto 3	0.4
Ponto 4	0.7
Ponto 5	1.8
Ponto 8	0.7

* Diferença significativa no nível de significância de 5% pelo teste do Qui-quadrado, em relação ao controle negativo.

Os pontos 1 e 5 apresentaram maior número de células binucleadas, contudo estatisticamente não são valores significativos.

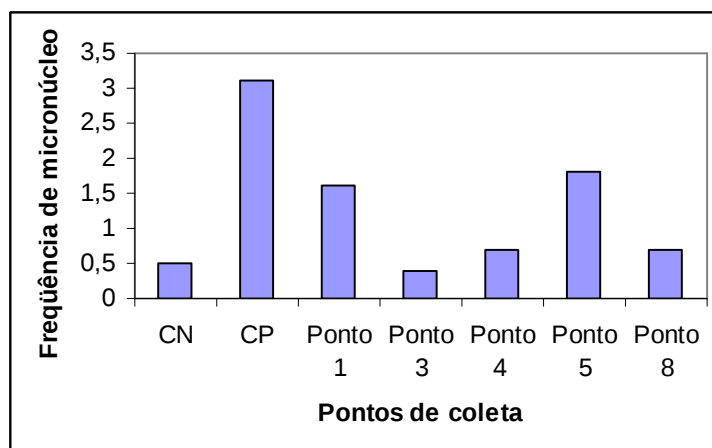


Figura 22. Frequência de células binucleadas com micronúcleo, de CHO-K1 tratadas com as amostras de água da refinaria REPLAN.

3.4.5 Conclusões

A análise de mutagenicidade revela que, para todas as amostras de água coletadas, há ausência de efeito mutagênico, sugerindo a ausência ou presença em baixas concentrações de substâncias que promovem danos mutagênicos nas células de CHO-K1.

Pode-se observar pelos resultados que os ensaios realizados com amostras do ponto 3 que o efluente industrial após tratamento tem a frequência de células binucleadas dentro do padrão aceitável para o ensaio.

3.4.6 Referências

BROCKMAN, H.E.; STACK, H.F.; WATERS, M.D. **Antimutagenicity profiles of some natural substances.** Mutation research, n. 267, p. 157-172, 1992.

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

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed) *mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação.* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991.

3.5. Ensaio biológico empregando o peixe *Danio rerio*

3.5.1 Introdução

Brachydanio rerio é mais conhecido como *Danio rerio* e tem cerca de 5cm de comprimento quando adulto. Popularmente é conhecido peixe zebra ou paulistinha dado à semelhança de suas 5 faixas longitudinais azul escuras inseridas no corpo prateado. Trata-se de espécie de peixe ovípara empregada como ornamental. Este peixinho vive na natureza em cardumes e não sobrevive quando isolado. Alimenta-se de *Daphnia*, *Artemisa* e *Turbifex* (pequeno verme), suporta entre 15 e 40C°. É originário da Índia oriental e Bangladesh, vive até 3 anos e tem como ótimo um fotoperíodo de 8 horas.



Figura 23. *Danio rerio*, peixe utilizado como indicador da toxicidade das águas analisadas.

Os ensaios de toxicidade com *Danio rerio* foram realizados no Campus de Limeira – CESET (UNICAMP), de acordo com a norma NBR 12714 31/5/93, em condições estáticas de 96 horas e avaliadas de acordo com a mobilidade dos animais.

3.5.2 Resultados

Ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* – primavera.

O ensaio foi realizado em 05/11/07 e em conformidade com a NBR 12714 de 31.05.1993.

Tabela 20. Toxicidade aguda para *Danio rerio* quando submetido à amostras de água coletadas no Rio Jaguari (P1), no Efluente Industrial da Replan após tratamento biológico (P3), Rio Atibaia montante (P4) e jusante (P8).

Amostra	Nº organismos imóveis				Imobilidade	
	1	2	3	4	total	%
Controle	0/4	1/4	0/4		1/12	8,3
REPLAN 1	2/4	0/4	1/4		3/12	25,0
REPLAN 3	¼	0/4	0/4		1/12	8,3
REPLAN 4	0/4	1/4	2/4		3/12	25,0
REPLAN 8	0/4	1/4	1/4		2/12	16,7
Resultado: CE(I)50;96 H:					Intervalo de Confiança 95%:	

* Teste realizado segundo a NBR – 15088 de 30/06/04

Tabela 21. Parâmetros relativos aos valores de pH, condutividade, turbidez, dureza (mg/L), oxigênio dissolvido (O.D.) e cor (em PtCo) em amostras de água : Rio Jaguari (P1), efluente industrial da Replan tratado (P3), Rio Atibaia montante (P4) e jusante (P8).

	Amostra	pH	Condutividade µS/cm	Turbidez NTU	Dureza mg/L CaCO ₃	OD mg/L O ₂	Cor PtCo
Tempo 0	Controle	7,58	110,5	0,80	40,0	4,50	5,0
	REPLAN 1	7,35	116,0	10,9	30,0	3,84	99,0
	REPLAN 3	8,42	1670,0	6,28	142,0	5,15	116,0
	REPLAN 4	7,69	254,9	16,4	38,0	4,20	111,0
	REPLAN 8	7,79	274,5	15,2	36,0	4,50	108,0
96 horas	Controle	7,13	115,9	1,21	42,0	2,50	13,0
	REPLAN 1	7,14	113,8	4,42	32,0	3,86	58,0
	REPLAN 3	8,37	1538,0	4,63	145,0	3,10	96,0
	REPLAN 4	7,44	278,0	3,61	33,0	2,88	51,0
	REPLAN 8	7,43	280,1	4,65	40,0	2,56	55,0

Os dados inseridos na Tabela 21 são de apoio ao ensaio com *Danio rerio*.

Pôde-se concluir que as amostras ambientais não possuem potencial para causar toxicidade aguda ao peixe *Danio rerio*, em conformidade com a Resolução CONAMA nº 357 de 17.07.2005.

Os Pontos REPLAN 1 e REPLAN 4 demonstram indícios de toxicidade aguda para o *Danio rerio* (Tabela 20) e referem-se às águas dos Rios Jaguari e do Rio Atibaia montante à descarga do efluente tratado da Replan.

Ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* – período chuvoso verão.

Segundo ensaio com *Danio rerio* realizado na 16ª coleta de 19/03/08.

Tabela 22. Viabilidade de *Danio rerio* submetido ao ensaio biológico de toxicidade aguda nas amostras de água do Rio Jaguari (P1), do Efluente Industrial da Replan após tratamento biológico (P3), do Rio Atibaia montante (P4) e jusante (P8).

Amostra	Nº organismos imóveis				Imobilidade	
	1	2	3	4	total	%
Controle		0/4	0/4		1/12	8,3
REPLAN 1	¼	1/4	2/4		4/12	33,3
REPLAN 3	0/4	4/4	1/4		5/12	41,7
REPLAN 4	0/4	2/4	0/4		2/12	16,7
REPLAN 8	2/4	0/4	0/4		2/12	16,7
Resultado: CE(I)50;96h					Intervalo de Confiança 95%:	

* Teste realizado segundo a NBR – 15088 de 30/06/04

Tabela 23. Parâmetros relativos aos valores de pH, condutividade, turbidez, dureza (mg/L), oxigênio dissolvido (O.D.) e cor (em PtCo) em amostras de água : Rio Jaguari (P1), efluente industrial da Replan tratado (P3), Rio Atibaia montante (P4) e jusante (P8).

96 h	Amostra	pH	Condutividade µS/cm	Turbidez NTU	Dureza mg/L CaCO ₃	OD mg/L O ₂	Cor PtCo
	Controle	8,37	175,0	2,0	45,0	4,69	14,0
	REPLAN 1	6,48	46,8	151,0	15,0	2,98	550,0
	REPLAN 3	7,37	681,6	8,28	97,0	4,74	96,0
	REPLAN 4	7,30	74,8	54,3	22,0	2,02	550,0
	REPLAN 8	7,46	74,0	24,0	24,0	3,22	452,0

Em função do período de coleta, as características das águas são diferentes, como indicam as Tabelas 22 e 23.

O ensaio biológico com o minipeixe *Danio rerio*, segundo a NBR 12714/1993 indica que as amostras coletadas em 05/11/07 dos pontos P1 e P4 demonstram indícios de toxicidade. Verifica-se ainda pelas amostras avaliadas que os pontos 3 e 8 não demonstram toxicidade ao *D. rerio* nesta coleta. Contudo na coleta de 19/03/08, os pontos que apresentaram indícios de toxicidade foram P1 e P3. Estes resultados podem estar relacionados ao menor teor de oxigênio dissolvido, pois os demais ensaios de toxicológicos não confirmam estes dados. O *Danio rerio* como organismo teste é sensível à depleção de oxigênio. Deve-se considerar ainda o período de coleta-tempo chuvoso.

O ponto 1 relaciona-se com a água do Rio Jaguari sem receber o efluente, e o Ponto 3, o efluente tratado, sendo que a diferença foi pequena considerando-se as condições.

Tabela 24. Ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* – Teste primavera (9/9/08)

Amostra	Nº organismos imóveis				Imobilidade	
	1	2	3		total	%
Controle	0/4	0/4	0/4		0/12	0,0
REPLAN 1	0/4	0/4	0/4		0/12	0,0
REPLAN 3	0/4	0/4	0/4		0/12	0,0
REPLAN 4	0/4	0/4	0/4		0/12	0,0
REPLAN 8	0/4	0/4	0/4		0/12	0,0
Resultado: CE (I)50;96h					Intervalo de Confiança 95%:	

* Teste realizado segundo a NBR – 15088 de 30/06/04

Verifica-se pela Tabela 24, apoiada nos valores da Tabela 25 que nesta coleta (primavera) não houve indícios de toxicidade ao *D. rerio*.

Tabela 25. Parâmetros relativos aos valores de pH, condutividade, turbidez, dureza (mg/L), oxigênio dissolvido (O.D.) e cor (em PtCo) em amostras de água : Rio Jaguari (P1), efluente industrial da Replan tratado (P3), Rio Atibaia montante (P4) e jusante (P8).

Amostra	pH	Condutividade μS/cm	Turbidez NTU	Dureza mg/L CaCO ₃	OD mg/L O ₂	Cor PtCo
Controle	7,80	159,0	0,64	45	6,40	1,0
REPLAN 1	6,85	110,4	6,93	42	5,61	80,0
REPLAN 3	7,76	2877,0	5,45	200	5,60	140,0
REPLAN 4	7,42	275,4	26,55	45	5,93	154,0
REPLAN 8	7,38	329,4	27,40	49	5,08	163,0

3.5.3. Conclusão

Conclui-se com os ensaios realizados no período chuvoso e na primavera, que não houve índice de toxicidade, contudo serão necessários a realização de mais ensaios para comparação de algum indício de toxicidade ao *Danio rerio* no período de chuvas (verão).

3.6. Análises de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs

Tabela 26. Análise dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs:montante e jusante do lançamento no Rio Atibaia.

HPAs	VMP CONAMA 357 Art 15	PERÍODOS DE COLETA NO RIO ATIBAIA											
		4/04/07		15/08/07		21/11/07		29/02/08		29/05/08		13/08/08	
		M*	J**	M*	J**	M*	J**	M*	J**	M*	J**	M*	J**
Benzo(a)pireno	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Benzo(b)fluoratenos	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Benzo(k)fluoratenos	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Criseno	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Acenaftileno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Fluoreno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Antraceno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Benzo(g,h,i)pirileno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Fenantreno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Dibenzo(a,h)antraceno	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Indeno(1,2,3,cd)pireno	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Pireno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Acenafteno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Fluoranteno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Naftaleno		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Benzo(a)antraceno	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

M* = montante a 100m do lançamento do efluente no Rio Atibaia; J** = jusante a 200m do lançamento do efluente no Rio Atibaia.

CONCLUSÃO: Os resultados mostram que as concentrações das substâncias denominadas “Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos” – HPAs estão em concentração abaixo do nível mínimo de detecção pelas metodologias recomendadas e atendem às exigências da legislação nos pontos analisados em diferentes períodos.

4- CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos mediante as análises das amostras das águas do Rio Jaguari, no ponto de captação para uso na Replan; Rio Atibaia montante, jusante (200m) e (500m) além do efluente após tratamento biológico e estabilização, em relação aos ensaios biológicos referentes à toxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, morte celular de células de mamíferos e ecotoxicidade.

As amostras recolhidas para as análises pontuais bem como daquelas resultantes das médias obtidas durante o período reportam-se a valores de não toxicidade, especialmente quanto a alterações do genoma dos organismos examinados, embora ocorram algumas morte dos organismos.

Desta forma, nos ensaios recomendados pela Deliberação PCJ de 058/06 de 12/12/2006, em seu item 7, do Comitê de Bacias Hidrográficas – PCJ, não demonstraram capacidade mutagênica, carcinogênica e morte celular. O ensaio de morte celular em células de mamíferos confirma a não toxicidade das amostras analisadas.

Todas as análises atenderam quanto a sua execução as normas do Standards Methods 1978; CETESB; CONAMA e Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, e tiveram o suporte de análises químicas, físicas e microbiológicas de todas as amostras.

As análises mensais do ponto 3 não identificaram hidrocarbonetos policíclicos aromáticos acima dos níveis de determinados pelos órgãos de controle ambiental, portanto, isentam a Replan de descarte destas substâncias.

Rio Claro, 6 de novembro de 2008

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

CRB 00588/84

Coordenação do projeto