

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DE ÁGUAS COLETADAS EM ÁREA DE INFLUÊNCIA DE REFINARIA DE PETRÓLEO, POR MEIO DO SISTEMA-TESTE DE *Oreochromis niloticus*

Corroqué, N.A.; Araújo, C.S.T.; Leme, D.M.; Caritá R.; Fernandes, T.C.C.; Angelis D.F.;
Marin-Morales M.A.

Universidade Estadual Paulista, Campus Rio Claro
na.corroque@yahoo.com.br

Palavras-chave: poluição de águas, efluentes industriais, refinaria de petróleo, micronúcleo, *Oreochromis niloticus*.

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 (LEME, 2007).

Descargas de efluentes industriais no meio aquático têm preocupado muitos pesquisadores, pela possibilidade de causar efeitos deletérios aos organismos expostos. Dentre os danos causados, destacam-se as alterações na molécula de DNA, que podem levar, não apenas a um sério comprometimento da saúde dos organismos, mas a um comprometimento das gerações futuras, uma vez que podem induzir o aparecimento de alterações herdáveis (RIBEIRO, 2003).

O teste do Micronúcleo (MN) é considerado, por muitos autores, como uma das mais promissoras técnicas de avaliação de efeitos mutagênicos induzidos por agentes químicos (RIBEIRO, 2003; MATSUMOTO et al., 2006). Tal fato se deve aos MN serem resultantes de danos, reparados ou reparados erroneamente, no material genético das células parentais (RIBEIRO, 2003), sendo facilmente visualizados nas células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém, de tamanho reduzido.

Eritrócitos de peixes, por serem nucleados, têm se mostrado muito adequados para a aplicação do teste do MN (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Além disso, a facilidade de obtenção de sangue periférico de peixes torna a técnica de MN ainda mais simples e rápida (GRASSI, 2002), característica esta indicada para testes de avaliação da contaminação ambiental.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível potencial mutagênico de águas coletadas na área de influência de uma refinaria de petróleo por meio do teste do MN em sistema-teste de *Oreochromis niloticus*.

Material e Métodos

Coleta das amostras de água

As coletas estudadas no presente trabalho foram realizadas em setembro de 2007 e abril de 2008, períodos estes que correspondem às estações de inverno e outono. Foram coletadas águas dos pontos: (P1) água do rio Jaguari no local de captação da refinaria; (P2) entrada da lagoa de estabilização (LE) da refinaria; (P3) saída da LE; (P4) água do rio Atibaia à montante do descarte das águas industriais; (P5) água do rio Atibaia à jusante da descarga do efluente industrial tratado proveniente da LE; (P6) entrada do tratamento biológico do efluente.

Bioensaio ex situ

Espécimes de *O. 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. Foram aclimatados a 23°C, com sistema de filtragem e aeração. Para cada bioensaio realizado, 5 espécimes foram separados, aleatoriamente, em 7 grupos experimentais.

Os grupos experimentais foram dispostos em 7 aquários contendo 15L cada, sendo 1 para o controle negativo (CN), realizado com água de poço artesiano, e os demais para as amostras coletadas. Para a amostra do P6 foi realizada uma diluição (proporção 2:1 v/v) com água de poço artesiano, por se caracterizar em uma amostra muito tóxica em ensaios preliminares.

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

Bioensaio in situ

Quatorze espécimes de *O. niloticus* foram divididos igualmente em duas gaiolas e colocados no rio Atibaia, no mês de abril de 2008, nos locais correspondentes aos P4 e P5. Após 7 dias de exposição, as gaiolas foram recolhidas para a retirada das amostras de sangue, por punção cardíaca, dos espécimes de *O. niloticus*.

O CN, referente a este bioensaio, foi realizado em laboratório como o descrito para o bioensaio *ex situ*.

Teste do MN

A confecção das lâminas foi feita por meio da técnica de esfregaços, sendo a primeira gota da seringa descartada com a finalidade de evitar contaminação do material. Foram realizadas duas extensões sanguíneas para cada espécime de *O. niloticus*. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e, após 24 horas, submetidas à coloração por reativo de Schiff.

Foram analisados 1000 eritrócitos por peixe, nos quais foram determinadas as frequências de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares (AN). A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, comparando os resultados dos tratamentos com o CN, a 0,05 de nível de significância.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos para o teste do MN em sistema-teste de *O. niloticus*, tanto para os bioensaios *ex situ* como o *in situ*, estão apresentados na tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Comparação dos valores de MN e AN observados em eritrócitos de *O. niloticus* expostos às águas da área de influência da refinaria. Coleta realizada em setembro de 2007.

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
	P2	0.33±0.57	14.00±9.54
	P3	1.00±1.15	71.50±66.00
	P4	0.60±1.00	80.80±56.00*
	P5	1.66±2.08	59.33±42.47
	P6	2.40±2.88	46.40±33.15

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.

Tabela 2. Comparação dos valores de MN e AN observados em eritrócitos de *O. niloticus* expostos às águas da área de influência da refinaria. Coleta realizada em abril de 2008.

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
	P2	1.73±1.71	45.41±39.83
	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
	P6	----	----

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.

Tabela 3. Comparação dos valores de MN e AN observados em eritrócitos de *O. niloticus* expostos às águas dos P4 e P5 em abril de 2008 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.

Foi observada uma mortalidade de espécimes de *O. Niloticus* nos bioensaios *ex situ*, para o tratamento realizado com a amostra de água do P6, coletada em abril de 2008, antes e após a diluição da mesma, na proporção 2:1 v/v, com água de poço artesiano. Tal resultado, que inviabilizou a aplicação do teste do MN nestes exemplares, provavelmente, é decorrente dos efeitos tóxicos da amostra. No entanto, esta toxicidade é esperada, uma vez que este ponto corresponde ao efluente bruto da refinaria, isto é, efluente sem qualquer tratamento de remoção de agentes químicos nocivos. Já para o bioensaio *in situ*, observou-se que, dos 14 peixes que foram expostos nos locais referentes aos P4 e P5, restaram apenas 5 indivíduos por gaiola. Neste caso, podemos sugerir que a mortalidade dos peixes não foi decorrente da toxicidade das águas dos referidos pontos, mas, provavelmente, do stress provocado pelo transporte dos animais.

A presença de AN tem sido reportada por alguns autores em diferentes organismos, inclusive em peixes (CARRASCO et al., 1990; SOUZA; FONTANETTI, 2006). A observação de eritrócitos portadores destas anormalidades pode ser um indicativo da presença de agentes tóxicos nestas águas. Alguns autores relacionam a presença de AN à presença de substâncias genotóxicas e ou mutagênicas, porém, esta relação não é totalmente conhecida. Assim, resultados de AN são utilizados como dados adicionais aos obtidos pelos testes do MN. (HOSHINA, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

No presente estudo, foi observado um valor significativo de AN, no bioensaio *ex situ*, para a amostra de água do P4, coletada em setembro de 2007. Este resultado, entretanto, não está relacionado com as atividades da refinaria, pois este ponto situa-se à montante do despejo do efluente da refinaria no rio Atibaia. Assim, os efeitos observados para esta amostra, provavelmente, são derivados de outras atividades industriais, já que esta região é conhecida por concentrar uma alta diversidade de indústrias.

O teste do MN é considerado como uma das mais promissoras técnicas para a avaliação de danos genéticos induzidos por poluentes ambientais. Esta técnica tem sido constantemente adaptada para a aplicação em diferentes organismos-teste, como é o caso dos peixes. Os peixes tem se caracterizado em um bom organismo para o teste do MN, pois responde de maneira rápida, além de ser de fácil obtenção e de baixo custo, o que leva a uma aplicação satisfatória para os estudos de contaminação ambiental (GRISOLIA; STARLING, 2001; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006). No presente trabalho, não foi observado nenhum valor significativo de MN para nenhum dos testes realizados, *ex situ* e *in situ*.

Desta forma, conclui-se que a ausência de efeitos mutagênicos no sistema-teste de *O. niloticus*, tanto para os bioensaios *ex situ* como *in situ*, indica uma eficiência no sistema de tratamento de efluentes adotado pela refinaria, garantindo assim a integridade do meio ambiente da área de influência da refinaria, principalmente dos ecossistemas aquáticos, que são destino final de seus efluentes.

Referências

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.
- 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.
- GRASSI, L.E.A. Uso da técnica de micronúcleos para avaliação de genotoxicidade em peixes do rio Jaguari e Atibaia – Bacia Hidrográfica do Rio Piracicaba – São Paulo – Brasil, In: **Hematologia, biometria, teor de compostos organoclorados e frequência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas**. 2002. 166 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002.
- GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant dischargers. **Mutation Research**, v.491, p.39-44, 2001.
- HOSHINA, M.M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de petróleo, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2005. 160 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2005.
- LEME, D.M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico das águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto na região**. 2007. 144 f (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.
- 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.
- RIBEIRO, L.R.; MARQUES E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p.21-27.
- SOUZA, T.S; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v.605, p.87-93, 2006.