

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Bacharelado em Ciências Biológicas



Monografia

Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes
contendo brometo de etídeo

Laura Lemons Moreira

PELOTAS, 2010

LAURA LEMONS MOREIRA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA PRELIMINAR DE
EFLUENTES CONTENDO BROMETO DE ETÍDEO**

Trabalho acadêmico apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Lilian Terezinha Winckler Sosinski

Co-Orientador: Beatriz Helena Gomes Rocha

Pelotas, 2010

Banca examinadora

Lilian Terezinha Winckler Sosinski – Embrapa Clima Temperado

Denilson Gouvêa Anthonisen – Embrapa Clima Temperado

Vera Lúcia Bobrowski – Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, Cleia e Mario, pela educação que me foi dada, imprescindível à realização deste trabalho e à conclusão deste curso. A eles e ao meu irmão Felipe, meu muito obrigada por terem sempre me apoiado nesta caminhada.

A minha orientadora Lilian, pela orientação e, principalmente, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Denilson, pela ideia, por acreditar em mim, e pela grande e valiosa ajuda durante esse trabalho, e também pela amizade, importante durante toda essa jornada.

Ao professor Daniel Prá por ter cedido a estrutura do Laboratório de Genética da UCPel para a realização do Ensaio cometa. A ele e ao pessoal do laboratório pela ajuda durante a realização deste teste, principalmente a Marília, pela ajuda nas análises.

As gurias do Laboratório de Ecotoxicologia, por todo o apoio na manutenção dos peixes e execução dos bioensaios e, as amigas do Laboratório de Biologia Molecular pelo companheirismo, compreensão e amizade.

Ao dindo, pela iniciação à vida científica e pelo apoio durante toda essa caminhada. Muito obrigada e desculpa se nem tudo saiu como o esperado.

Ao Renan, pela compreensão nos momentos de ausência devido à realização do trabalho, e pelo companheirismo durante todo esse período.

Aos amigos que fiz na faculdade, Evelise, Cristian, Karine e Vanessa pela amizade, pelas risadas e pelo convívio diário que certamente fará muita falta. E também à Raquel, que chegou no final, mas não precisou de muito tempo para nos cativar.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho e à conclusão deste curso.

Resumo

MOREIRA, Laura Lemons. **Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes contendo brometo de etídeo**. 2010. 33f. Monografia – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A avaliação e quantificação dos efeitos que os produtos químicos e os efluentes de laboratório podem causar no meio ambiente são de suma importância para um controle ambiental efetivo. Os testes de ecotoxicidade são amplamente utilizados na análise ambiental já que avaliam o grau de toxicidade dos efluentes lançados no meio ambiente e demonstram os efeitos sobre os organismos aquáticos. Além dos efeitos tóxicos dos efluentes, também é importante realizar análises genotóxicas, para avaliar efeitos não letais que os poluentes causam aos organismos. Nesse contexto, enquadra-se o Ensaio Cometa, pois avalia danos causados ao DNA. Laboratórios de instituições de pesquisa são geradores de resíduos e é necessário um maior conhecimento e controle em relação ao descarte destes resíduos. Os efluentes gerados na rotina de caracterização molecular apresentam toxicidade, contudo existem técnicas de tratamento eficientes para a sua redução. Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar os efeitos tóxicos e genotóxicos dos efluentes contendo brometo de etídeo, por meio de testes de toxicidade aguda utilizando o peixe *Danio rerio* e Ensaio Cometa, além de avaliar a eficiência dos tratamentos utilizados nestes efluentes. Os bioensaios de toxicidade foram realizados de acordo com norma da ABNT, utilizando 3 tratamentos e 5 diluições, em duplicata. Observou-se que os efluentes que contém brometo de etídeo, apresentam toxicidade aguda, e que os tratamentos utilizados não são eficientes para reduzir a toxicidade. O fator de toxicidade obtido para os efluentes brutos e tratados com hipoclorito de sódio equivale a 16. Os resultados obtidos no Ensaio Cometa indicam que a exposição de *Danio rerio* ao efluente contendo brometo de etídeo, tratado ou não, causa danos ao DNA destes organismos.

Palavras-chave: Bioensaio, zebrafish, Ensaio cometa, *Danio rerio*, toxicidade aguda, brometo de etídeo.

Abstract

MOREIRA, Laura Lemons. **Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes contendo brometo de etídeo**. 2010. 33f. Monografia – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The evaluation and quantification of the effects the chemical products and the laboratory effluents can cause in the environment are highly important to an effective environmental control. The ecotoxicity tests are widely used in environmental analysis since they evaluate the toxicity degree of the effluents discharged in the environment and demonstrate the effects on aquatic organisms. In addition to the toxic effects of the effluents, it is also important to make genotoxic analysis to evaluate the non-lethal effects that pollutants cause on organisms. Within this context, is the Comet Test, because it assesses the damage caused to the DNA. Research institution laboratories are waste generators, and it's necessary a greater knowledge and control over the discharge of this waste. The effluents generated in the molecular characterization routine present toxicity, however there are efficient techniques to its reduction. So, this work aims to characterize the toxic and genotoxic effects of the effluents containing ethidium bromide, through acute toxicity tests using the *Danio rerio* fish and the Comet Assay, and also to asses the efficiency of the treatments used in these effluents. The toxicity bioassays were performed according to standard ABNT rules, using 3 treatments and 5 dilutions, in duplicate. It was observed that the effluents containing ethidium bromide, present acute toxicity, and that the used treatments are not effective to reduce the toxicity. The toxicity factor obtained to the raw effluents and treated with sodium hypochlorite is equivalent to 16. The results obtained in the Comet Assay indicate that the exposure of the *Danio rerio* to the effluent containing ethidium bromide, either treated or not, causes damage to the DNA of these organisms.

Key words: Bioassay, zebrafish, Comet assay, *Danio rerio*, Acute toxicity, ethidium bromide.

Sumário

1	Introdução	7
2	Objetivos	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos.....	10
3	Revisão bibliográfica	11
3.1	Ecotoxicologia	11
3.2	Genotoxicidade	14
3.3	Brometo de etídeo (C ₂₁ H ₂ OBrN ₃).....	16
3.4	<i>Danio rerio</i> Hamilton – Buchanan, 1822	17
4	Metodologia	19
4.1	Organismo-teste.....	19
4.2	Soluções testadas	19
4.3	Testes de toxicidade.....	20
4.4	Ensaio Cometa.....	21
4.5	Delineamento experimental	22
5	Resultados e Discussão.....	24
5.1	Bioensaios.....	24
5.2	Ensaio cometa.....	26
6	Conclusão	29
7	Referências bibliográficas	30

1 Introdução

O cenário econômico restritivo e o crescente rigor da legislação ambiental provocaram o aumento da busca por estratégias para minimizar a geração de resíduos e os danos ao ambiente (ALBA et al., 2006). Nas últimas décadas, tornou-se evidente a necessidade de se tomarem providências para o controle do descarte de resíduos, evitando que os recursos naturais como água, solo e ar tornem-se ainda mais degradados (BENDASSOLII et al., 2003)

Comumente, o monitoramento ambiental é feito por meio de análises físico-químicas de águas residuárias. Contudo, nos últimos 20 anos, os testes de toxicidade com organismos aquáticos tornaram-se uma ferramenta efetiva para avaliação de efeitos de poluentes sobre os organismos vivos, e de risco/periculosidade de agentes químicos, para o monitoramento da qualidade da água e estabelecimento de limites permissíveis de lançamento de efluentes nos corpos hídricos (ZAGATTO, 1998).

Embora a avaliação ecotoxicológica seja uma ferramenta de suma importância para a análise da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos, são poucas as exigências da legislação brasileira com relação à ecotoxicidade de despejos de fontes poluidoras (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). A Resolução CONAMA nº 357/2005 apenas cita a utilização de ensaios ecotoxicológicos e toxicológicos para investigação de contaminantes capazes de causar danos aos seres vivos. No Rio Grande do Sul, a Resolução Consema 129/2006, que dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul, fixa critérios e padrões de emissão relativos à toxicidade de efluentes, estabelecendo o Fator de Toxicidade (FT) máximo a ser atingido.

Os testes de ecotoxicidade, ou bioensaios, são instrumentos da ecotoxicologia que servem para detectar impactos causados nos organismos aquáticos, uma vez que os resultados das análises químicas, por si só, não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes sobre o ecossistema (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São ferramentas importantes para apoiar o trabalho de

controle e de fiscalização ambiental, uma vez que por meio desses testes é possível obter parâmetros, avaliar o índice de poluição e grau de toxicidade dos efluentes lançados no meio ambiente.

Estes testes são amplamente empregados em análises de toxicidade de agrotóxicos, resíduos industriais e de laboratórios. Nakagome et al. (2007), utilizaram o peixe *Danio rerio* para avaliação de toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas de lavoura de arroz e Castro (2008) avaliou a toxicidade de efluentes industriais com o mesmo organismo-teste. Outros organismos também podem ser testados, como os crustáceos *Daphnia similis* e *Daphnia magna*, utilizados nos trabalhos de Georgetti et AL. (2008) e Brentano (2006), respectivamente, além de outros organismos como bactérias e algas.

Além dos efeitos tóxicos agudos dos efluentes, é necessário estudar os efeitos não-letais que os poluentes causam aos organismos aquáticos. Assim, as análises genotóxicas são indicadores de toxicidade e efeitos adversos, que podem ser alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. De acordo com Bücker et al. (2006), o Ensaio Cometa é um teste utilizado para avaliação genotóxica, uma vez que este possui alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA. O Ensaio Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula Única, é um método de estudo genotoxicológico que avalia danos ao DNA de células individuais. É utilizado amplamente na genética toxicológica, ecotoxicologia, biomonitoramento ambiental e outras aplicações, principalmente por possuir custo relativamente baixo e rapidez, além de avaliar qualquer tipo celular, em pequena quantidade de células.

Segundo Georgetti et al. (2008), embora os laboratórios das instituições de ensino e pesquisa sejam importantes entre os geradores de efluentes, a gestão ambiental nestes locais ainda é pouco discutida e estudada. Na sua totalidade, os centros de formação de recursos humanos (universidades e escolas) geram cerca de 1% dos resíduos perigosos em um país desenvolvido como os Estados Unidos. Ao contrário das unidades industriais, estes resíduos caracterizam-se por apresentarem volume baixo e elevada diversidade, o que dificulta a padronização das formas de tratamento e disposição (BENDASSOLLI et al., 2003), uma vez que a avaliação e quantificação dos efeitos que os produtos químicos e os efluentes de laboratório podem causar no meio ambiente constituem os primeiros passos para um controle ambiental efetivo.

Dentre os efluentes dos laboratórios de pesquisa, estão os efluentes gerados na rotina de caracterização molecular, que chamam atenção devido à presença do brometo de etídeo. O brometo de etídeo (EtBr) é um marcador molecular largamente utilizado em biotecnologia devido à sua capacidade de se intercalar com as bases dos ácidos nucleicos, tornando-os visíveis em luz ultravioleta. Este caráter intercalante do EtBr também é o responsável pelo seu alto potencial mutagênico, pois pode causar alterações na estrutura do DNA (TEIXEIRA et al., 1998) exigindo atenção para o seu descarte.

Acredita-se que a presença de brometo de etídeo nos efluentes do Laboratório de Biologia Molecular confira toxicidade aos despejos, contudo, julga-se que os tratamentos empregados usando ácido hipofosforoso e nitrito de sódio e hipoclorito de sódio sejam suficientes para reduzi-la.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho visa caracterizar os efeitos tóxicos dos efluentes que contém brometo de etídeo, bem como a eficiência das técnicas de tratamento utilizadas, por meio de testes de ecotoxicidade aguda, tendo como organismo-teste o peixe paulistinha ou zebrafish (*Danio rerio*).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o Fator de Toxicidade (FT) dos efluentes contendo brometo de etídeo bruto e tratado.
- Avaliar a genotoxicidade destes efluentes, por meio do Ensaio Cometa.
- Avaliar a eficiência dos tratamentos aplicados aos efluentes contendo brometo de etídeo para a redução da toxicidade e genotoxicidade.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Ecotoxicologia

Embora a exposição às substâncias químicas presentes em medicamentos, alimentos, produtos de higiene pessoal, de limpeza, cosméticos, poluição, e às diversas fontes de radiação natural e artificial seja comum, destes agentes físico-químicos, apenas uma pequena parcela possui estudos que avaliam seus efeitos sobre os seres humanos e outros organismos (FERRARO, 2009).

Toxicologia ambiental é o termo usado para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas no ambiente (CHASIN; PEDROZO, 2003).

Dentro do contexto da toxicologia ambiental encontra-se a ecotoxicologia, que, segundo Matias (1996), é a ciência que estuda os impactos deletérios de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes com o meio ambiente (mobilidade, degradabilidade, bioacumulação e bioamplificação).

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut. Segundo este autor, a Ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado. Deste modo, a ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Consideram-se objetivos da ecotoxicologia avaliar a toxicidade de poluentes em laboratório e no meio ambiente; compreender os mecanismos de ação de substâncias tóxicas e avaliar o risco que substâncias ou compostos químicos tóxicos apresentam para o meio ambiente (BRENTANO, 2006), uma vez que a presença destas substâncias no meio ambiente pode causar inúmeras alterações nos

organismos que entram em contato com elas, incluindo efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (MENDES, 2004).

Baseando-se no pressuposto de que se um agente é tóxico para uma ou mais espécies em um sistema de teste, é provável que o seja para importantes componentes do ecossistema e, portanto, possa causar impacto ambiental negativo (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). O controle da toxicidade de resíduos lançados no ambiente aquático é, portanto, de suma importância para a saúde do ecossistema e do homem.

Segundo Lobo e Callegaro (2000), o termo geral “monitoramento da qualidade da água” inclui tanto o monitoramento físico e químico quanto o monitoramento biológico, sendo o último complementar aos outros. Desses dois enfoques, o monitoramento biológico destaca-se basicamente em função de dois importantes argumentos. Primeiro, os organismos apresentam uma resposta integrada ao seu ambiente, e, segundo, se o que interessa é manter comunidades biológicas saudáveis, é muito mais apropriado monitorar as comunidades aquáticas que somente as variáveis físicas e químicas, uma vez que o resultado do teste ecotoxicológico baseia-se na resposta da biota ao conjunto de substâncias que compõe o meio aquático (BRENTANO; LOBO, 2003).

A aplicação de testes ecotoxicológicos é uma ferramenta capaz de auxiliar o monitoramento de lançamento de efluentes nos corpos receptores de modo que não haja alteração na biota aquática decorrente da toxicidade de determinados compostos (BRESOLA, 2007).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água, tem se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil. A primeira iniciativa em termos metodológicos se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Atualmente, vários ensaios de toxicidade estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados por organizações como a ABNT. Estas metodologias incluem testes com diferentes espécies marinhas e de água doce, de diferentes níveis tróficos, dentre as quais microalgas e macrófitas como *Selenastrum capricornutum* e *Lemna minor*, organismos zooplancctônicos como *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, além de peixes como *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* (CASTRO, 2008).

Os bioensaios têm como vantagem abranger uma grande variedade de substâncias biologicamente disponíveis em uma amostra ambiental através de um único ensaio, e detectam a capacidade inerente de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Os métodos de testes de toxicidade aquática podem ser categorizados de acordo com o tempo de exposição, situação de teste, efeitos a serem avaliados e organismos a serem testados (RAND, 1995). Em geral, o princípio do método de avaliação de toxicidade ambiental consiste na exposição de organismos-teste a várias diluições da amostra a ser testada, por um período determinado de tempo (ABNT, 2003).

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. A toxicidade aguda é o efeito deletério (usualmente letalidade ou alguma outra manifestação que a anteceda) causado por amostra, simples ou composta, a organismos-teste em um curto período de exposição, em relação ao seu ciclo de vida. Já a toxicidade crônica é o efeito deletério causado por amostra, simples ou composta, que afeta uma ou mais funções biológicas dos organismos-teste (como sobrevivência, crescimento, reprodução ou comportamento), em um período de exposição que pode abranger todo seu ciclo de vida ou as fases iniciais de seu desenvolvimento (CONSEMA, 2006).

A avaliação ecotoxicológica aguda de corpos de água, com organismos aquáticos, constitui uma abordagem exploratória para evidenciar um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos domésticos e industriais (BERTOLETTI; ZAGATTO, 2006). No Rio Grande do Sul a resolução 129 de 2006 do CONSEMA prevê padrões de toxicidade de efluentes líquidos de fontes poluidoras, estabelecendo um fator de toxicidade (FT) a ser atingido em prazos

variáveis de 2 a 14 anos, dependendo da vazão da fonte poluidora (CONSEMA, 2006). O FT representa a menor diluição da amostra na qual não se observa efeito deletério sobre os organismos expostos, sendo o valor de FT diretamente proporcional à toxicidade da amostra. O FT é determinado através da observação direta da letalidade dos organismos na série de soluções-teste e é expresso por um número inteiro que corresponde ao fator de diluição da solução teste (Quadro 1), não sendo calculado estatisticamente. No exemplo, o FT é igual a 8.

Quadro 1. Exemplo do cálculo para determinar valor de FT de uma solução.

Fator de diluição	Nº de organismos mortos ao final do teste		Peixes mortos em %
	Réplica A	Réplica B	
Controle	0	0	0
1	5	5	100
2	3	4	70
4	2	1	30
8	0	0	0
16	0	0	0

Fonte: Knie e Lopes, 2004.

3.2 Genotoxicidade

Genotoxicidade pode ser definida como a capacidade de uma amostra alterar a estrutura ou função da molécula de DNA (CONSEMA, 2006), sendo os agentes genotóxicos definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

Devido às implicações ecológicas associadas com genotoxicidade, a detecção e quantificação de danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Os testes de genotoxicidade são utilizados na toxicologia ambiental para o conhecimento e prevenção de patologias e aberrações cromossômicas decorrentes da exposição aos contaminantes, sendo que, uma das suas formas de estudo é o biomonitoramento por meio de uma metodologia baseada no Ensaio Cometa, um teste realizado em células individuais não proliferativas que detecta danos no DNA (IANISTCKI et al., 2006).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos ou físicos (TICE et al., 2000), A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas, ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA, 2003).

A genotoxicidade pode ser avaliada pelo teste de Ames, teste de micronúcleos e o ensaio do Cometa, entre outros (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003).

O Ensaio do Cometa ou *Single Cell Gel* (SCG) Assay é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia (SINGH et al., 1988). É um teste de genotoxicidade que se desenvolveu rapidamente, nos últimos anos, representando um papel importante em muitas áreas (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003). Rydeberg e Johanson (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente o dano no DNA de células individuais, e Singh et al. (1988) modificaram a técnica, utilizando uma eletroforese alcalina (pH>13) capaz de detectar quebras das fitas simples do DNA e em sítios álcali-lábeis. Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos induz mais quebras em fitas simples do que em fitas duplas do DNA, a versão alcalina da técnica apresenta maior sensibilidade para a detecção da indução de danos ao DNA (TICE et al., 2000), uma vez que, durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA (ROJAS et al., 1999).

O Ensaio Cometa tem ampla utilização para teste de agentes genotóxicos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparo no DNA, biomonitoramento de populações expostas, bem como em aplicações clínicas. As vantagens deste ensaio incluem a sua simplicidade, rápido desempenho e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (GONÇALVES et al., 2003).

O Ensaio Cometa foi descrito por Silva (2007) de forma bastante simplificada, onde as células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que força a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano

detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA.

Esta é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas. Esta técnica tem amplas aplicações em toxicologia genética, em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, no biomonitoramento ambiental e no monitoramento populacional humano (ROCHA et al., 2009).

3.3 Brometo de etídeo ($C_{21}H_{20}BrN_3$)

O brometo de etídeo (Fig. 1) é um fluorocromo utilizado em laboratórios de Biologia Molecular para visualização de ácidos nucleicos submetidos à técnica de eletrofose em gel de agarose. É um composto aromático que se intercala às bases do DNA, formando complexos fluorescentes, facilmente visíveis em radiação ultravioleta.

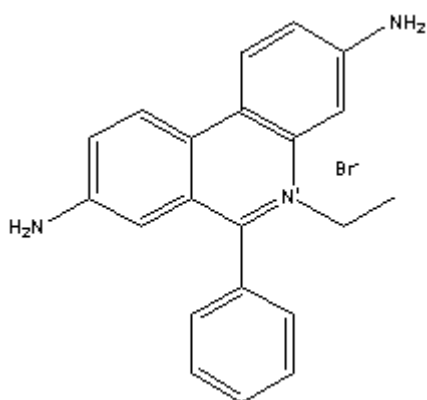


Figura 1. Fórmula estrutural do brometo de etídeo

O brometo de etídeo é comumente usado em laboratórios de estudos genéticos devido ao seu baixo custo e à sua sensibilidade para a maioria das necessidades experimentais (BIOTIUM, 2008). No entanto, tem propriedades altamente mutagênicas e é considerado carcinogênico e tóxico ao sistema reprodutivo devido à sua propriedade de se intercalar ao DNA. Assim, pode representar um problema de segurança importante e um perigo para o ambiente durante o seu descarte.

Contudo, apesar de ser um potente agente mutagênico, é citado como moderadamente tóxico (SAMBROOK et al., 2001). Além disso, pode ser nocivo por inalação, ingestão e absorção pela pele. Também é irritante para as mucosas e trato respiratório (OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, 2009).

Embora haja outros corantes comerciais, alternativas mais seguras em relação brometo de etídeo, esses corantes frequentemente têm um comprometimento significativo quanto à sensibilidade (BIOTIUM, 2008).

Uma das formas de minimizar o problema de descarte desta substância é o tratamento químico para inativar as propriedades tóxicas da molécula por meio do rompimento químico do anel aromático, pelo uso de substâncias ativadas como resina e carvão ou mesmo pela queima em fornos de alta temperatura de resíduos acumulados em papéis (LUNN; SANSONE, 1987). Além destes, é recomendado o tratamento com hipoclorito de sódio e com ácido hipofosforoso e nitrito de sódio, que são reagentes baratos e com grande disponibilidade no mercado (TONIOLO-SILVA; NOGUEIRA, 2006). No entanto, os produtos desses tratamentos também podem ser mutagênicos e tóxicos. Os produtos de descontaminação utilizando hipoclorito de sódio permanecem com 20% da atividade mutagênica do produto original. Já os produtos do processo com ácido hipofosforoso e nitrito de sódio mantêm 0,6% da atividade mutagênica (SAMBROOK et al., 2001).

3.4 *Danio rerio* Hamilton – Buchanan, 1822

O peixe *Danio rerio* é um teleósteo da família Cyprinidae comumente utilizado em testes toxicológicos.

Segundo a ABNT (2004), esta é uma espécie de peixe tropical, ovípara, omnívora, de comprimento médio de 4 a 5cm, sendo vulgarmente conhecida como paulistinha ou zebrafish. Esta espécie é originária da Índia e do Paquistão, sendo comum em diversas partes do mundo. No Brasil, é uma espécie exótica, vendida como ornamental.

O uso de *Danio rerio* em testes de toxicidade pode ser atribuído principalmente aos seguintes aspectos: é uma espécie disponível comercialmente em muitos países, facilmente cultivada em laboratório, mostra sensibilidade satisfatória para

ampla gama de substâncias químicas e é internacionalmente reconhecido como espécie para uso em testes ecotoxicológicos (KNIE; LOPES, 2004).

As vantagens da utilização de peixes como organismos modelo incluem a facilidade com que teleósteos, especialmente espécies pequenas, podem ser mantidas no laboratório e expostas a substâncias químicas tóxicas. Além disso, os peixes frequentemente respondem aos tóxicos de forma semelhante aos vertebrados superiores, por isso podem ser usados nos ensaios de exposição aos produtos químicos com potencial de causar efeitos teratogênicos e cancerígenos em humanos.

Embora a espécie seja citada como de fácil cultivo, alguns autores discordam dessa afirmação, uma vez que a manutenção dos alevinos em laboratório apresenta algumas particularidades, devido a dificuldade de alimentação das pós-larvas em função do reduzido tamanho.

4 Metodologia

4.1 Organismo-teste

O organismo-teste utilizado foi o peixe *Danio rerio* Hamilton – Buchanan, 1822 (Teleostei – Cyprinidae).

Diversas tentativas de reprodução, onde se conseguia facilmente a postura dos ovos, mas não a manutenção dos alevinos, foram feitas. Por esse motivo, optou-se pela compra dos peixes para a execução dos ensaios.

Foram utilizados peixes comprados no comércio local e, a fim de garantir que os mesmos estivessem em condições similares para serem submetidos ao ensaio, estes foram aclimatados em laboratório na Estação Experimental Terras Baixas (ETB) da Embrapa Clima Temperado, por pelo menos 30 dias. Estes peixes foram mantidos em tanques de 150 litros, com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e foram alimentados com ração comercial para peixes ornamentais, do tipo floculada, cinco vezes ao dia.

4.2 Soluções testadas

As soluções utilizadas nos testes de toxicidade são tampões TBE (Tris 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2mM) utilizados nas cubas de eletroforese, prática comum em laboratórios de biologia molecular. O brometo de etídeo é colocado no gel de agarose e, durante a eletroforese, parte dele é dissolvida no tampão TBE.

Devido à presença do brometo de etídeo, este tampão é classificado como resíduo tóxico e, antes do descarte, recebe tratamento. Os tratamentos utilizados podem ser de dois tipos, onde o primeiro consiste na adição de hipoclorito de sódio (ARMOUR, 1996) e o segundo de uma solução de ácido hipofosforoso e nitrito de sódio (LUNN; SANSONE, 1987). Nos dois casos, as soluções ficam em repouso por 24 horas e, antes do descarte, é feita a neutralização do pH.

Na rotina do laboratório de biologia molecular da Embrapa Clima Temperado, onde são realizadas em média duas corridas por dia em cada cuba, num total de 4 cubas, este tampão é trocado a cada 3 dias e estocado, para então receber tratamento e ser descartado na pia. Para o ensaio, foi utilizado este tampão estocado, sendo adicionadas as soluções descontaminantes adequadas a cada

tratamento. Para a descontaminação com hipoclorito de sódio, este foi adicionado ao tampão contendo brometo de etídeo na proporção de 3:1 (ARMOUR, 1996). Já na descontaminação com ácido hipofosforoso e nitrito de sódio, a solução descontaminante foi constituída de 20mL de uma solução a 5% de ácido hipofosforoso e 12mL de uma solução 0,5M de nitrito de sódio e empregada uma proporção 3:1 de solução descontaminante e resíduo respectivamente (LUNN E SANSONE, 1987).

4.3 Testes de toxicidade

Foram realizados ensaios de toxicidade aguda, que pode ser definida como efeito deletério causado pela amostra na sobrevivência dos organismos-teste, no período de exposição do ensaio (ABNT, 2004), que geralmente compreende 24-48h.

Os ensaios preliminares de toxicidade aguda com *Danio rerio* foram realizados de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2004) e conduzidos na Embrapa Clima Temperado – Pelotas/RS.

A alimentação dos peixes foi interrompida 24 horas antes do início do ensaio, situação que permaneceu ao longo das 48 horas de ensaio. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos e mantidos com fotoperíodo de 15 horas de luz. Durante o teste, a temperatura foi mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os testes foram conduzidos em béquer de 2L, com 1,5L de solução e 4 organismos-teste cada. Para cada tratamento (T1, T2 e T3), foram utilizadas 5 diluições além do controle negativo, de acordo com o fator de diluição já mencionado.

Para a manutenção da temperatura ideal à execução do ensaio, este foi realizado em incubadora para DBO. Após a escolha dos frascos-teste, foi determinado o número de peixes por frasco, não ultrapassando a proporção 1g/L (massa do organismo/volume de solução-teste), conforme NBR 15088. Além disso, por se tratar de um estudo exploratório, teve-se a preocupação de preservar o maior número de organismos possível.

A diluição das amostras foi feita com água de diluição, e os organismos do controle mantidos nesta mesma água. A água de diluição consiste na adição de CaSO_4 , KCl , NaHCO_3 , MgSO_4 em água destilada, com pH entre 7 e 7,6. Antes do

início dos ensaios, estas amostras foram aeradas por 24h e foram feitas medidas de pH, oxigênio dissolvido (OD), potencial de oxi-redução e condutividade, e o pH ajustado para a mesma faixa da água de diluição, com HCl e NaOH, de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2004).

Os resultados dos testes foram expressos por meio do Fator de Toxicidade (FT).

4.4 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado no Laboratório de Genética da Universidade Católica de Pelotas, de acordo com protocolo seguido pelo mesmo. A coleta de sangue dos peixes foi realizada, com seringa, logo após o término dos testes de ecotoxicidade, por meio de corte da cauda dos peixes sobreviventes. O sangue foi armazenado em tubos do tipo eppendorf com anti-coagulante, e diluído em 100µL de PBS (Phosphate buffered saline). A coleta de sangue foi realizada em sala escura para que a radiação ultravioleta não produzisse danos ao DNA, uma vez que esta radiação induz mutações. Com a mesma finalidade, os tubos para armazenamento do sangue foram cobertos por papel alumínio para impedir a penetração de luz.

O material foi levado ao laboratório para a execução do ensaio, de acordo com protocolo descrito por Tice et al. (2000), com modificações. As células sanguíneas foram misturadas a agarose “low melting point” (LMP) na proporção de 5:95 µL e a mistura espalhada em lâmina pré-coberta em agarose normal. Após, estas lâminas foram incubadas em solução de lise celular gelada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH 10), recentemente adicionado de Triton X-100 1% e dimetil sulfóxido (DMSO 10%). As lâminas foram mantidas nesta solução por sete dias a 4°C e, então, submetidas a corrida eletroforética. A eletroforese ocorreu em tampão alcalino NaOH 300mM e EDTA 10mM, por 15 minutos a 25V e 270mA. Após a eletroforese, foi feita neutralização em solução de Tris 0,4M pH 7,5, a fixação e a coloração com nitrato de prata.

A análise dos cometas foi realizada através da contagem de cem células por indivíduo, selecionadas aleatoriamente (50 por lâmina, 2 lâminas por indivíduo), visualizadas em microscópio óptico. O dano foi visualmente determinado pela classificação das células (Fig. 2), de acordo com o tamanho da cauda, em cinco classes de migração de DNA.

De acordo com a classificação visual das células, foi calculado o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD), além do número de cometas em cada classe de dano. O Índice de Dano é total da multiplicação do número de cometas em cada classe multiplicado pelo dígito denominador da classe, enquanto que a Frequência de Dano corresponde a porcentagem do número de células com cauda pelo número total de células analisadas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste do qui-quadrado, por meio do software Graphpad prisma 5.0.

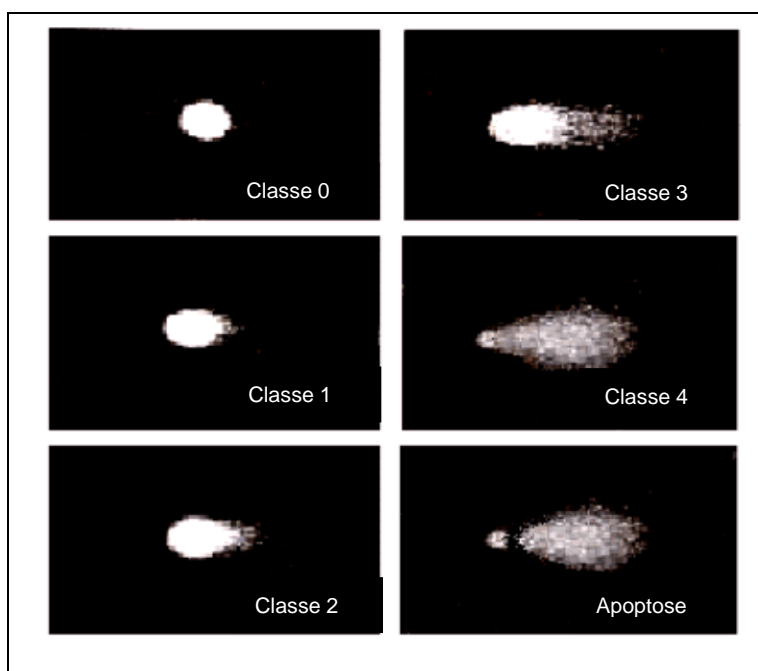


Figura 2. Classes de migração de DNA no ensaio cometa.

Fonte: TREVIGEN (2009)

4.5 Delineamento experimental

Para os testes, foi utilizado o tampão antes do tratamento (T1), o tampão tratado com hipoclorito de sódio (T2) e o tampão tratado com ácido hipofosforoso e nitrito de sódio (T3) e água de diluição (Controle). Para cada uma destas soluções, foram utilizadas cinco diluições, de acordo com os requisitos para o ensaio de toxicidade aguda presentes na NBR 15088 da ABNT (2004). De acordo com a mesma norma, foram feitas as diluições (Tabela 1).

Tabela 1. Preparo de soluções-teste para ensaio com efluentes.

Solução teste %	Fator de diluição	Volume da amostra mL	Volume de água de diluição mL	Volume final mL
100	1	1500	-	1500
50	2	750	750	1500
25	4	375	1125	1500
12,5	8	187,5	1312,5	1500
6,25	16	93,75	1406,25	1500
Controle	-	-	1500	1500

Fonte: Adaptado de NBR 15088 (ABNT, 2004)

O ensaio composto por 15 tratamentos foi realizado em duplicata.

A avaliação toxicológica foi feita por meio da determinação do fator de toxicidade (FT) e da mortalidade, enquanto a avaliação genotoxicológica foi feita através do ensaio cometa. As variáveis de monitoramento completam a avaliação dos tratamentos. Foram monitorados valores de pH, OD (oxigênio dissolvido) e condutividade.

Quadro 2. Variáveis envolvidas na avaliação dos efluentes contendo brometo de etídeo

Tratamentos	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		
	Concentração de efluente	Solução de tratamento	Avaliação da toxicidade	Variáveis de monitoramento	Avaliação da genotoxicidade
11	100%	Sem tratamento	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FT ▪ Mortalidade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH ▪ OD ▪ Condutividade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensaio Cometa
12	50%				
13	25%				
14	12,5%				
15	6,25%				
21	100%	NaClO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FT ▪ Mortalidade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH ▪ OD ▪ Condutividade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensaio Cometa
22	50%				
23	25%				
24	12,5%				
25	6,25%				
31	100%	H ₂ PO ₃ NaNO ₂	<ul style="list-style-type: none"> ▪ FT ▪ Mortalidade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH ▪ OD ▪ Condutividade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensaio Cometa
32	50%				
33	25%				
34	12,5%				
35	6,25%				

5 Resultados e Discussão

5.1 Bioensaios

Os resultados dos ensaios de toxicidade com o peixe *Danio rerio* foram semelhantes na maioria dos tratamentos, todos com alta mortalidade, o que indica alta toxicidade dos efluentes analisados. As taxas de mortalidade em cada tratamento após 48h de exposição são apresentadas na tabela 1.

Tabela 2. Mortalidade do peixe *Danio rerio* após 48h de exposição às soluções. Pelotas, 2009

Tratamento	Diluição (%)	Fator de diluição	Mortalidade após 48h (%)*
T11	100	1	100
T12	50	2	100
T13	25	4	87,5
T14	12,5	8	50
T15	6,25	16	0
T21	100	1	100
T22	50	2	100
T23	25	4	100
T24	12,5	8	100
T25	6,25	16	0
T31	100	1	100
T32	50	2	100
T33	25	4	100
T34	12,5	8	100
T35	6,25	16	50
Controle	100	-	0

*valores referentes às duas repetições

Ao avaliar a tabela, pode-se perceber que apenas as amostras mais diluídas dos tratamentos T1 e T2 não apresentaram mortalidade. No entanto, o tratamento 3 apresentou mortalidade em todas as diluições, sendo o mais tóxico para o organismo *Danio rerio*.

Não houve morte dos peixes no controle, o que caracteriza a validade dos testes, uma vez que para o ensaio de toxicidade ser válido, precisa apresentar mortalidade menor que 20% nos controles (ABNT, 2004).

Um fator que deve ser considerado é alta mortalidade apresentada já nas primeiras horas de exposição aos efluentes. A primeira verificação foi realizada após

2 horas do início do ensaio, e os tratamentos sem diluição já apresentavam 100% de mortalidade nos três tratamentos, assim como T32 e T33.

Os testes de toxicidade empregando *Danio rerio* indicam que as amostras de efluentes contendo brometo de etídeo apresentam efeitos agudos, antes e depois de tratadas. O valor de FT (fator de toxicidade) para os tratamentos T1 e T2, é igual a 16, uma vez que esta foi a diluição que não apresentou letalidade. Já para a amostra T3 não foi possível determinar FT, sendo necessário testar maior número de diluições.

Toniolo-Silva e Nogueira (2006) afirmam que o tratamento utilizando hipoclorito de sódio, apesar de facilmente encontrado, gera anidrido benzóico como produto de reação, mais tóxico do que o produto inicial.

Analisando os resultados deste trabalho, conclui-se que a solução residual ainda se mantém tóxica, oferecendo riscos para os organismos que entrarão em contato com a mesma. Esta toxicidade da solução residual também foi verificada por Toniolo-Silva e Nogueira (2006), que testaram a toxicidade dos resíduos contendo brometo de etídeo em bulbos de cebola e sementes de tomate.

O estudo de Baptista et al. (2000), onde avaliaram a eficiência de uma estação de tratamento de efluentes de uma indústria têxtil, revelou a importância de se avaliar ecotoxicologicamente a eficiência do tratamento de efluentes, uma vez que o efluente tratado causou toxicidade aguda à bactéria *Vibrio fischeri*.

As variáveis pH, OD e condutividade foram monitoradas nos ensaios de toxicidade agudos, sendo feitas medições nos tempos 0, 24 e 48 horas. As medidas de pH e OD pouco variaram no tempo e entre as amostras. No entanto, as medidas de condutividade diferiram quando comparados os tratamentos e o controle.

As medidas de condutividade dos tratamentos, sem diluição, foram 3,56 mS/cm (T11), 19,15 mS/cm (T21) e 7,19 mS/cm (T31), enquanto a água de diluição onde foram mantidos os peixes do controle apresentou condutividade igual a 0,165 mS/cm. Convém destacar que a condutividade é utilizada como uma medida geral da qualidade da água e estudos indicam que a faixa adequada para peixes e macroinvertebrados é entre 0,15 e 0,5 mS/cm (EPA, 2006).

A avaliação de toxicidade dos efluentes de laboratório permite caracterizá-los e pode contribuir na tomada de decisão acerca dos custos de uso de diferentes

metodologias de tratamento de resíduos, auxiliando assim na gestão de resíduos de laboratório. Os elevados níveis de toxicidade dos efluentes testados neste trabalho demonstram a necessidade de maiores estudos a fim de que a sua toxicidade seja minimizada.

5.2 Ensaio cometa

Para o ensaio cometa, foram analisadas amostras de sangue coletadas de organismos-teste sobreviventes nos três níveis referentes ao tratamento dos resíduos: sem tratamento, T1, tratado com NaClO, T2, e com H₂PO₃/NaNO₂, T3. Foram avaliados T1 (6,25%), T2 (6,25 e 25%), T3 (6,25 e 25%) e o controle.

As células são analisadas de acordo com a presença de dano e quanto ao grau do dano (I a IV), onde 0 (zero) representa ausência de dano. Na figura 3 são apresentadas algumas células encontradas na análise e, na tabela 3 são apresentados os resultados da análise de células das seis amostras para o Ensaio do Cometa, incluindo os números de células encontradas em cada classe de dano, o índice de dano e a frequência de dano em cada amostra analisada.

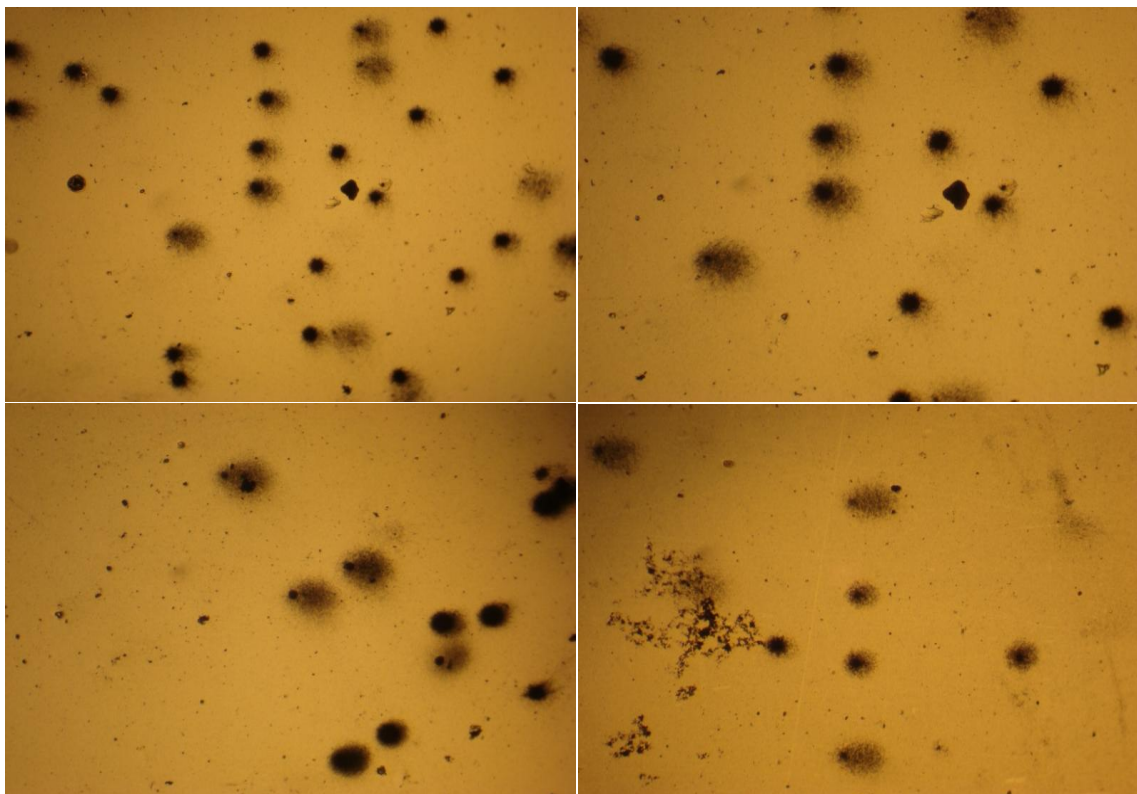


Figura 3. Cometas encontrados na análise de células do peixe *Danio rerio* expostos aos efluentes testados.

Tabela 3. Número de células em cada classe de dano, índice de dano e frequência de dano nos diferentes tratamentos analisados. Pelotas, 2009.

Tratamento	Número de células por Classes de Dano					Índice de Dano (ID)	Frequência de Dano (FD)
	0	I	II	III	IV		
T23	40	14	6	8	32	178	60
T33	37	12	11	26	14	168	63
T15	76	10	6	8	0	46	24
T25	68	20	10	2	0	46	32
T35	66	30	4	0	0	38	34
Controle	93	6	0	1	0	9	7

No controle, predomina a inexistência de danos (93%), diferindo estatisticamente dos tratamentos ($p < 0.0001$). Por outro lado, somente nos tratamentos T23 e T33, em que o efluente está diluído a 25%, há ocorrência do dano máximo (IV), respectivamente de 32 e 14%, o que representa redução significativa para esta variável quando utiliza-se a mistura $H_2PO_3/NaNO_2$, em lugar de NaClO. Comparando os mesmos tratamentos, não há diferença significativa para índice e frequência de dano.

Esta mesma situação ocorre quando comparados os tratamentos T15, 25 e 35, em que os valores de ID e FD são semelhantes. No entanto, na amostra T35 não há ocorrência de dano III.

De acordo com Quillardet et al. (1988) a solução de brometo de etídeo tratada com hipoclorito permanece com 20% de sua atividade mutagênica. Segundo testes realizados pelos autores do método que utiliza ácido hipofosforoso e nitrito de sódio, após o tratamento, o resíduo de brometo de etídeo perde a atividade mutagênica (LUNN; SANSONE, 1987), contudo, através da análise com o ensaio cometa, é possível perceber que a solução residual ainda causa danos ao DNA de células de *Danio rerio*.

Da mesma forma, o trabalho de Grinevicius (2006) mostrou que, nos organismos-teste expostos a 20% do efluente da estação de tratamento de uma indústria têxtil, houve um aumento nas frequências das classes de maior dano (classes 2, 3 e 4), em relação ao controle. Porém, o índice de dano deste efluente têxtil tratado foi bem menor quando comparado ao efluente da mesma indústria sem tratamento, diferindo significativamente ($p < 0,001$).

Na figura 4 são apresentadas as relações entre o número de células encontradas para cada classe de dano e os diferentes tratamentos. Ao observar tais relações é possível perceber a redução gradativa no número de células por classe de dano quando amostras mais diluídas dos efluentes são utilizadas nos ensaios (T15, T25 e T35), independentemente do nível de tratamento (Quadro 1) aplicado ao resíduo. Este fato não se reproduz quando efluentes com maior concentração são testados (T23 e T33), tanto quando tratados com NaClO quanto pela mistura $H_2PO_3/NaNO_2$.

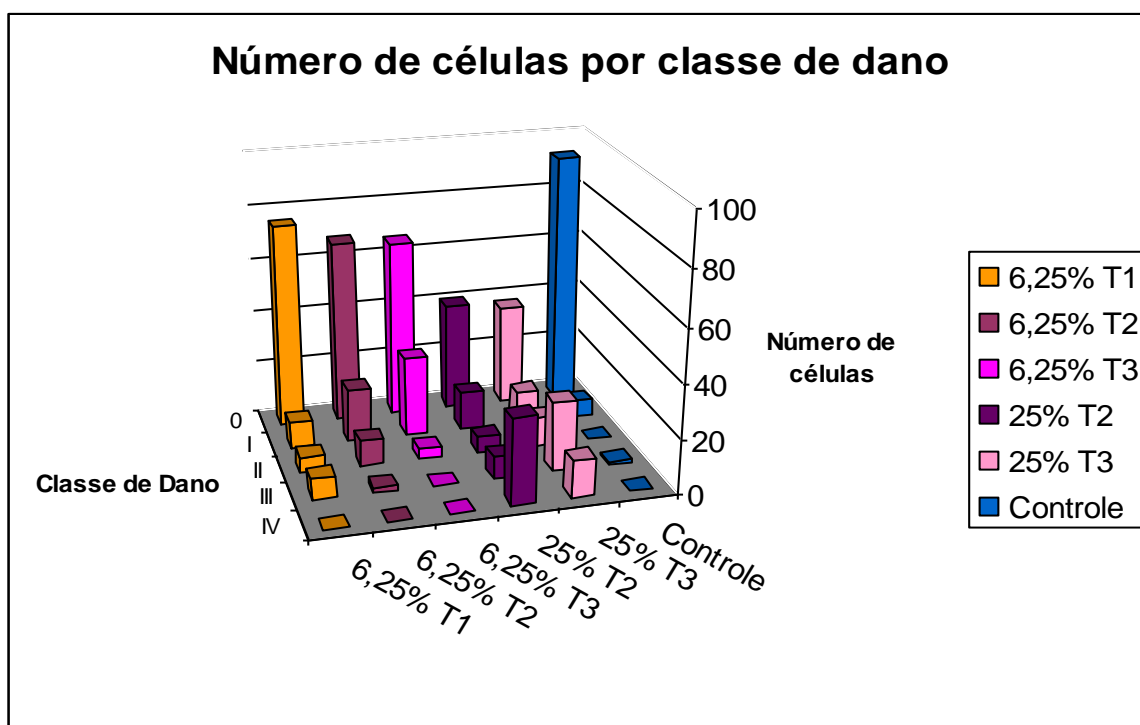


Figura 4. Relação do número de células encontradas em cada Classe de Dano no Ensaio Cometa para as amostras analisadas.

6 Conclusão

Ao caracterizar os efeitos tóxicos dos efluentes que contém brometo de etídeo, usando como bioindicador *Danio rerio*, é possível concluir que os níveis de toxicidade são elevados.

O fator de toxicidade obtido para os efluentes bruto e tratado com hipoclorito de sódio equivale a 16.

Os tratamentos aplicados, usando NaClO ou mistura de H_2PO_3 e $NaNO_2$ não reduzem de maneira significativa os efeitos tóxicos e genotóxicos dos efluentes contendo brometo de etídeo.

Os resultados obtidos no Ensaio Cometa indicam que a exposição de *Danio rerio* ao efluente contendo brometo de etídeo, tratado ou não, causa danos ao DNA destes organismos.

Os valores da condutividade nos tratamentos que apresentaram mortalidade podem ser um indicativo de que esta é uma medida determinante para a sobrevivência dos peixes.

7 Referências bibliográficas

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713**: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2003. 16 p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. São Paulo, 2004. 19 p.

ALBA, J. M. F.; BÜTTOW, M. V.; BRITES, G. M. **Avaliação de insumos agrícolas por meio de testes ecotoxicológicos: fase preliminar**. 1 ed. Pelotas: Editora Embrapa/CPACT. 2006. Comunicado Técnico, 134. 4p.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. 2003. 135p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ARMOUR, M. A. **Hazardous laboratory chemicals disposal guide**. 2 ed. EUA: CRC Press, 1996, 546p.

BAPTISTA, I. E.; SOARES, C. H. L.; MATIAS, W. G.; LOPES, E. B. 2000. Avaliação da toxicidade Aguda de efluentes de uma indústria têxtil utilizando *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Vibrio fischeri* como bioindicadores. In: Espíndola; E. L. G.; Paschoal, C. M. R. B.; Rocha, O.; Bohrer, M. B. C.; Oliveira Neto, A. L. (Eds.). Ecotoxicologia, Perspectivas para o século XXI. Rima, São Paulo, São Carlos. p. 365-377.

BENDASSOLLI, J. A., MÁXIMO, E.; TAVARES, G. A.; IGNOTO, R. DE F. Gerenciamento de resíduos químicos e águas servidas no laboratório de isótopos estáveis do CENA/USP. **Química Nova**, Vol. 26, No. 4, 612-617, 2003

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Aplicação dos Ensaio Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima, 2006. p. 347-382.

BIOTIUM - Glowing Products for Science. **Safety Report of GelRed and GelGreen - A Summary of Mutagenicity and Environmental Safety Test Results from Three Independent Laboratories**. 2008. Disponível em: <http://www.biotium.com/product/product_info/Safety_Report/GR%20&%20GG%20safey.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2009.

BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. 2006. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRENTANO, D. M.; LOBO, E. Biomonitoramento de caráter ecotoxicológico no Vale do Rio Pardo, RS, Brasil. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, n. 2, v. 7, p. 85-95. 2003.

BRESOLA, R.C. **Avaliação de toxicidade de mananciais em áreas degradadas pela mineração com a utilização do bioindicador *Scenedesmus subspicatus* e implementação de metodologia de toxicidade com peixe *Danio rerio* popular “zebrafish”**. 2007. 69p. Monografia (Engenharia Ambiental). Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A., Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**. vol. 36(3), p. 357-364. 2006.

CASTRO, A. A. A. S. de. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes industriais utilizando *Danio rerio* Hamilton-Buchanam, 1822 (Teleostei, Cyprinidae)**. 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.

CHASIN, A. A. da M.; PEDROZO, M. de F. M. O estudo da toxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. 340p.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.

CONSEMA (Conselho Estadual do Meio Ambiente). **Resolução nº 129**, de 24/11/2006. Porto Alegre. 2006.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. 2003. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 424p.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Conductivity**. Monitoring and Assessing Water Quality. Volunteer Stream Monitoring: A Methods Manual. 2006. Disponível em: <<http://www.epa.gov/volunteer/stream/vms59.html>>. Acesso em: 2 dez. 2009.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 2009. 118f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética). UFPR, Curitiba.

GEORGETTI, M. S.; ROCHA, O.; SALVADOR, N.N.B. Impactos tóxicos causados pelo lançamento de efluentes químicos em corpos d'água. In: III Workshop de Ecotoxicologia. 2008. **Holos Environment**, vol. 8, n. 2, Suplemento 1. 2008.

GONÇALVES, L.M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALLA-JUNIOR, C. Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. In: II Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, 2003. Itajaí, SC. Livro de Resumos. Vol.1. Itajaí: UNIVALI, p 384. 2003.

GRINEVICIUS, V. M. A. de S. **Avaliação da remediação de efluentes de uma indústria têxtil utilizando bioindicadores e biomarcadores**. 2006. 161f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFSC, Florianópolis.

IANISTCKI, M.; BENVENU, V. C.; GROFF, A. A.; SCHRODER, N. T.; SILVA, J. O. ensaio cometa em *Cantareus aspersus* no biomonitoramento da genotoxicidade dos poluentes atmosféricos no campus da ULBRA. In: II Jornada de Iniciação Científica - Meio Ambiente - Fundação Zoobotânica do RS e FEPAM. Porto Alegre, 2006.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes com peixes: Toxicidade aguda letal sobre *Danio rerio*. In: Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA: GTZ, 2004. p 84-106.

LOBO, E. A.; CALLEGARO, V. L. Avaliação da qualidade de águas doces continentais com base em algas diatomáceas epilíticas: Enfoque metodológico. In: TUCCI, C. E. M.; MARQUES, D. M. Avaliação e Controle da Drenagem Urbana. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. 2000. p. 277- 300.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. **Analytical Biochemistry**, London, v.162, n.2, p.453, 1987.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. vol 12, n. 3, p. 355-381. 2008. Disponível em: < <http://www.oecologia.biologia.ufrj.br> >. Acesso em: 6 jul. 2009.

MATIAS, W. G. **Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, in vivo et in vitro**. 1996. 183p. Tese (Doutorado em Toxicologia Ambiental). Universite de Bordeaux, Bordeaux, França. 1996.

MENDES, C. J. **Caracterização dos efluentes líquidos em termos de ecotoxicidade gerados na disposição de RSU nos "aterros" do entorno de Criciúma – SC**. 2004. Monografia (Curso de Engenharia Ambiental). UNESC, Criciúma, 2004.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba. vol. 17, p. 117-122, jan/dez. 2007.

OKLAHOMA STATE UNIVERSITY. **Laboratory Safety Manual**: Appendix F. Disponível em: <http://ehs.okstate.edu/hazmat/LABMAN/Appendix-F.htm>. Acesso em 9 dez 2009.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M.; BENSUADE, O. Ethidium bromide and safety - readers suggest alternative solutions. **Trends in Genetics**, v. 4, n. 4, p. 89-90, abr. 1988.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2ª edição. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995. 1125p.

ROCHA, C. A. M.; CUNHA, L. A.; PINHEIRO, R. H. S.; ALMEIDA, V. H. C.; SAGICA-JUNIOR, J. C.; SOUZA, Y. S. R.; MORAES, L. S. Avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa em *Aequidens tetramerus* (Perciformes: Cichlidae) expostos ao metilmercúrio. **Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindóia, SP. 2009. ISBN 978-85-89109-06-2.

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

RYDERG, B.; JOHANSON, K.J. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: HANAWALT, P.C.; FRIEDBERG, E.C.; FOX, C.F. (Ed.). **DNA Repair Mechanisms**. New York, p. 465-468. 1978.

SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ed. New York: CSHL Press, 2001. 2.344 p.

SILVA, J. da. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**. vol 2, n. 2, p. 30-33. 2007. Disponível em: <<http://www.geneticanaescola.com.br/Ano2vol2.html>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

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

TEIXEIRA, K. R. dos S., PIRES, W. de O., BALDINI, J. I. **Descontaminação de substâncias tóxicas: fenol e brometo de etídeo**. 1 ed. Seropédica: Editora Embrapa/CPNAB. 1998. Comunicado Técnico, 25. 3p.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, p.206-221, 2000.

TONIOLO-SILVA, P. H.; NOGUEIRA, A. R. A. **Definição de protocolo para o tratamento de resíduos contendo brometo de etídeo**. Anais do I Simpósio de iniciação científica da Embrapa pecuária sudeste. Documentos Embrapa Pecuária Sudeste, nº 62. 2006. São Carlos, SP. ISSN 1980-6841.

TREVIGEN INC. Disponível em: <http://www.cometassay.com>, acesso em 06 de novembro de 2009.

ZAGATTO, P. A. Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: resultados publicados. In: 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia – Perspectivas da ecotoxicologia no Brasil. 1998. Itajaí.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 464 p.