



**AVALIAÇÃO MÚLTIPLA DO POTENCIAL
GENOTÓXICO DA POLUIÇÃO URBANA**

**DE
PORTO ALEGRE - RS**

ADRIANA HELENA LAU

*Tese apresentada ao PPG em Genética
e Biologia Molecular da UFRGS como
um dos quesitos para obtenção do
grau de Doutor em Ciências.*

Orientador: Prof. Dr. BERNARDO ERDTMANN

PORTO ALEGRE

2002

O teste Cometa e o teste de mutações cromossômicas em pêlos estaminais de *Tradescantia* foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O teste de Ames foi realizado pela pesquisadora Izabel Vianna Villela no Laboratório GENOTOX do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os dados pluviométricos foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia, 8º Distrito de Meteorologia do Rio Grande do Sul. As coletas e as leituras de parâmetros físico-químicos foram realizadas pela Divisão de Pesquisa (DVP) do Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE) da Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Esta pesquisa foi financiada pelo DMAE e pelo Laboratório de Citogenética da UFRGS, com apoio do CNPq, CAPES e FAPERGS.

Esta tese é dedicada a todas as pessoas que trabalham e/ou preocupam-se com a conservação e preservação do ambiente.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Bernardo Erdtmann, pelo seu enorme coração. Pela crítica constante enriquecida pela sua habilidade em apontar o que é certo e justo, e valorizar o que é fundamental. Foi devido aos caminhos que me apontaste que eu conquistei os meus objetivos. Obrigada.

Ao Dani pela ajuda e disposição constantes no trabalho de laboratório. Foram muitas noites, mas o resultado está aqui. Muitas provas que cuidaste para mim e muitas aulas em que me ajudaste, com total dedicação.

Ao Cadu porque o seu desalento quando as coisas davam erradas, me fazia reagir de forma a encontrar forças para prosseguir, e não deixar que ele desistisse de me ajudar.

Ao Juliano pelos testes com as Tradescantia.

À Tanise e Nusha pela amizade e companheirismo.

Obrigada à Jaque e ao Lulis pelo apoio constante, amizade, incentivo e companheirismo. Adri, tenho muitas saudades de ti. Espero que estejas bem aí na UCS.

Valeu Clênio pelas muitas vezes que me picaste, sem deixar hematomas. Tu sempre acertas o alvo!

Elmo e Ellen, sem vocês a minha tese seria toda em preto e branco!!! Obrigada por toda a atenção e alegria que vocês me dão.

Ao Ricardo Adami do DEMAÉ pela amizade, carinho e absoluta competência naquilo que faz, e pelas amostras que nunca deixou faltar.

À Maria Mercedes Bendati por ter acreditado no nosso projeto e ter feito com que ele acontecesse.

À Maria da Graça Ortolan pela rapidez e cuidado ao me fornecer as leituras dos parâmetros físico- químicos. Obrigada por estares sempre disposta a me ajudar nas minhas dúvidas e colaborar eficientemente com a minha pressa.

À Ana Laura do INMET que me ajudou com as planilhas e leitura dos dados pluviométricos.

Ao Dr. João Antônio Pegas Henriques e Izabel Vianna Villela por terem cedido seus resultados para serem comparados aos meus. Vamos escrever logo o nosso artigo Bel!!!

Ao Dr. Geraldo Stachetti Rodrigues e Dr. Paulo Saldiva pelas mudas de Tradescantia e por me ajudarem a sonhar com o projeto de monitoramento do ar.

À Jandira Fachel pela análise estatística e disposição, mesmo com tantos compromissos a cumprir.

Aos meus colegas e amigos da ULBRA por toda a ajuda e compreensão nesta fase final. Em especial ao Daniel, meu fornecedor de material visual para as aulas.

Aos meus queridos amigos do Expresso 25 que me ajudam a manter a sanidade, me alegram, e junto comigo fazem soar a harmonia da vida. Amo vocês. Espero que juntos tenhamos todo o sucesso que merecemos e toda a grana que já gastamos.

Aos meus amigos da São Mateus pelos anos de convívio, força, compreensão e apoio. Obrigada ao Richard pelo tempo em que estive ao meu lado me ajudando sempre. As coisas mudam, mas a minha gratidão vai ser eterna.

Ao Deco pelo companheirismo, amor, incentivo e gentileza. Tenho muita sorte de ter um amigo como tu.

A ti Paco, que entraste na minha vida durante este processo. Pelo carinho imenso que não me deixa desmoronar mesmo que eu não veja possibilidades. Tu sempre vêes as soluções e me fazes buscar por elas, meu amor.

À minha mãe Maria Helena por todas as provas corrigidas e notas fechadas no prazo. Te amo muito mãe.

À minha mãe Eli pelo apoio e força constantes em tudo o que eu faço. Te amo muito também, igualzinho ao que amo a outra mãe.

Ao meu pai e meu irmão pelas críticas que me conduzem adiante.

À Adriana, Silvane e Marina pela ajuda na formatação da bibliografia.

Ao Kiko e a Cá pela amizade que dura desde a faculdade e pelas festas nas quais me fizeram ir.

À minha família, pela torcida e oração, e a Deus que os ouviu.

Nós não queremos causar poluição, ou destruir as coisas, porque essas coisas têm valor para o homem em termos de saúde pública e qualidade de vida. No entanto, existe um segundo tipo de ética ambiental, uma que reconhece todos os motivos mencionados, mas também dá valor ao ambiente, incluindo animais, plantas e habitats. Esse é um valor intrínseco, do ambiente pelo ambiente, independentemente de qual valor nós concedemos a ele.

Peirce, Weiner e Versilind, 1998.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. A Importância do Monitoramento <i>in Loco</i>	1
I.2. Descrição dos Sistemas de Monitoramento Usados.....	5
I.2.1. Planárias.....	5
I.2.2. <i>Tradescantia</i>	9
I.3. O Teste Cometa.....	11
I.4. Testes de Mutação Gênica.....	13
I.4.1. O Teste de Ames ou ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma.....	13
I.4.2. O Trad-SHM.....	14
I.5. Dimensão do Problema.....	15
I.5.1. A Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba.....	15
I.5.2. O Projeto Pró-Guaíba.....	16
I.6. OBJETIVOS.....	20
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
II.1. Curva de Sensibilidade de <i>G. schubarti</i> Mixoplóide Determinada a Partir do Teste Cometa.....	21
II.2. Experimento de Avaliação da Permanência do Dano no DNA de <i>G. schubarti</i> Mixoplóide Após Exposição ao Clastogênico MMS.....	22
II.3. Testes de Monitoramento <i>in Loco</i> em Porto Alegre.....	23
II.3.1. Poluição da Água.....	23
II.3.1.1. Amostragem <i>in Loco</i>	25
II.3.1.2. Monitoramento da Bacia Hidrográfica do Guaíba.....	25
II.3.1.2.1. Teste Cometa em <i>G. tigrina</i>	25
II.3.1.2.2. Monitoramento da Qualidade das Águas Através da Coleta de Parâmetros Físico-Químicos.....	26
II.3.1.2.3. Pluviosidade.....	26
II.3.1.3. Teste Cometa em <i>G. schubarti</i> e <i>G. schubarti</i> Mixoplóide para Comparação da Sensibilidade em Relação à <i>G. tigrina</i>	28
II.3.1.4. Teste de Ames.....	28
II.3.2. Poluição do Ar.....	28
II.4. Descrição dos Testes.....	29
II.4.1. Planárias.....	29
II.4.1.1. Origem.....	29

II.4.1.2. Cultivo.....	29
II.4.1.3. Exposição e Manutenção dos Testes.....	29
II.4.1.4. Exposição para o Controle Positivo.....	30
II.4.2. Teste Cometa.....	30
II.4.2.1. Controle Interno do Teste.....	30
II.4.2.2. Suspensão Celular.....	30
II.4.2.3. Procedimento do Teste Cometa.....	31
II.4.3. <i>Salmonella typhimurium</i>	32
II.4.4. Teste de Ames ou teste de reversão gênica em <i>Salmonella typhimurium</i>	32
II.4.5. <i>Tradescantia</i>	33
II.4.5.1. Origem.....	33
II.4.5.2. Cultivo.....	33
II.4.5.3. Exposição.....	33
II.4.6. Teste <i>Trad</i> -SHM.....	33
II.5. Análise Estatística.....	34
III. RESULTADOS.....	35
III.1. Curva de Sensibilidade de <i>G. schubarti</i> Mixoplóide Determinada a Partir do Teste Cometa.....	35
III.2. Permanência da Resposta Positiva Induzida pelo MMS em <i>G. schubarti</i> Mixoplóide.....	37
III.3. Resultados do Monitoramento <i>in Loco</i> em Porto Alegre.....	38
III.3.1. Monitoramento das Águas da Bacia do Guaíba pelo Teste Cometa em <i>G. tigrina</i>	38
III.3.1.1. Correlação do Índice de Dano (ID) entre Grupo-Teste e Controle Negativo (C-).....	41
III.3.1.2. Índice de Dano (ID) das Águas Testadas.....	41
III.3.1.3. Diferença entre Pontos de Coleta.....	42
III.3.1.4. Comparação entre as Estações do Ano.....	45
III.3.1.5. Comparação dos Resultados Obtidos no Ano 2000 com o Obtido em 2001.....	50
III.3.1.6. Comparação do Índice de Dano Menos Controle Negativo (DELTANEG) com a Pluviosidade.....	51
III.3.1.7. Comparação do Índice de Dano Menos Controle Negativo (DELTANEG) com Parâmetros Físico-Químicos.....	52
III.3.2. Comparação da Sensibilidade entre <i>G. tigrina</i> , <i>G. schubarti</i> e <i>G. schubarti</i> Mixoplóide.....	57

III.3.2.1. Índice de Dano (ID) das Águas Testadas.....	60
III.3.2.2. Comparação entre as Estações do Ano.....	61
III.3.3. Teste de Ames.....	64
III.3.4. Testes Piloto para a Padronização do Monitoramento do Ar <i>in Loco</i> Através do Teste <i>Tra</i> -SHM.....	65
IV. DISCUSSÃO.....	69
IV.1. Avaliação da Genotoxicidade Ambiental.....	69
IV.2. As Planárias como Organismos-teste para Avaliação do Potencial Genotóxico de Amostras Ambientais.....	70
III.3. Quebras de Fitas do DNA como Bioindicadoras Sensíveis de Genotoxicidade.....	73
III.4. O Teste Cometa Aplicado à Avaliação do Potencial Genotóxico de Amostras Ambientais.....	74
III.5. Avaliação do Potencial Genotóxico das Águas da Bacia Hidrográfica do Guaíba na Região Metropolitana de Porto Alegre – RS.....	77
III.5.1. Correlação do Índice de Dano (ID) entre os Grupos-Teste e Controle Negativo (C-).....	78
III.5.2. Resultados do Teste Cometa na Avaliação do Potencial Genotóxico das Águas da Bacia Hidrográfica do Guaíba.....	79
III.5.3. Correlação entre os Resultados do Teste Cometa e Parâmetros Físico- Químicos Coletados pelo DMAE.....	82
III.6. Comparação da Sensibilidade entre <i>G. tigrina</i> , <i>G. schubarti</i> e <i>G. schubarti</i> Mixoplóide.....	86
III.7. Comparação entre os Resultados do Teste Cometa e de Ames.....	88
III.8. Testes-piloto para a Padronização do Monitoramento do Ar <i>in Loco</i> Através do Teste <i>Tra</i> -SHM.....	94
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	98
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	100
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
VIII. ANEXOS.....	112
ANEXO 1. Tabelas dos parâmetros físico-químicos coletados pelo DMAE organizadas por ponto de coleta.....	112
ANEXO 2. Listagem dos códigos dos parâmetros coletados.....	121
ANEXO 3. Tabelas de correlações entre parâmetros biológicos e físico-químicos medidos.....	122

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificações do Guaíba e dos seus principais afluentes através do IQA, segundo o Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE).....	17
Tabela 2. Controle negativo e doses de MMS usadas para obter-se a curva de sensibilidade de <i>G. schubarti</i> mixoplóide.....	21
Tabela 3. Tempo de reparação em <i>G. schubarti mixoplóide</i> após exposição ao MMS.....	22
Tabela 4. Estações do ano, datas e períodos de coleta das amostras e índice pluviométrico.	27
Tabela 5. Resultados da curva de sensibilidade de <i>G. schubarti</i> mixoplóides expostas ao mutagênico de ação direta MMS, determinada a partir do teste Cometa.....	35
Tabela 6. Permanência do dano no DNA em <i>G. schubarti</i> mixoplóide após exposição ao clastogênico MMS (16×10^{-2} mM) durante 5 horas ao longo do tempo (h) avaliada pelo teste Cometa.....	37
Tabela 7. Teste Cometa em <i>G. tigrina</i> para Avaliação do Potencial Genotóxico da Poluição da Águas da Bacia do Guaíba.....	40
Tabela 8. Teste de homogeneidade de variâncias e ANOVA para verificar se há diferenças entre os pontos de coleta testados com <i>G. tigrina</i>	42
Tabela 9. Comparação entre ID – C- dos pontos de coleta localizados no Guaíba obtidos no teste Cometa em <i>G. tigrina</i>	43
Tabela 10. Resumo do monitoramento do Guaíba com <i>G. tigrina</i> . Média e desvio padrão do controle negativo, índices de dano e dano menos controle negativo dos locais ou pontos de coleta.....	44
Tabela 11. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para a comparação entre as estações dos anos de 2000 e 2001 amostradas e avaliadas pelo teste Cometa em <i>G. tigrina</i>	46
Tabela 12. Comparação entre as estações do ano quanto à variável índice de dano.....	47
Tabela 13. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para verificação da diferença das respostas obtidas por ano de coleta no teste Cometa em <i>G. tigrina</i> quanto aos parâmetros índice de dano (DANO) e índice de dano menos controle negativo (DELTANEG).....	50
Tabela 14. Índices pluviométricos totais em relação ao período de coleta e índice de dano menos controle negativo total da estação.....	52
Tabela 15. Matriz dos componentes principais rotados agrupando as diversas variáveis físico-químicas.....	54
Tabela 16. Comparação das sensibilidades de <i>G. tigrina</i> , <i>G. schubarti</i> e <i>G. schubarti</i> mixoplóide através do teste Cometa.....	58
Tabela 17. Testes estatísticos para comparação de sensibilidade entre espécies.....	59
Tabela 18. Teste t para amostras pareadas para verificar a diferença entre as sensibilidades das planárias <i>G. tigrina</i> , <i>G. schubarti</i> e <i>G. schubarti</i> mixoplóide em relação à variável de interesse ID – C-.....	60

Tabela 19. Resultado do teste t de amostras pareadas para verificar a diferença entre o índice de dano e o controle negativo nas planárias pertencentes aos três grupos testados...	60
Tabela 20. Resumo da estatística para a comparação entre as estações verão 2000/2001 e inverno 2001 quanto à variável ID – C- agrupadas por espécie.....	61
Tabela 21. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para testar a diferença entre o verão entre 2000 e 2001 e o inverno de 2001 quanto à variável de interesse ID – C- tomando-se os dados dos três grupos de planárias em conjunto.....	62
Tabela 22. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para testar as diferenças entre as estações quanto aos índices de dano induzidos tomando-se os dados dos três grupos-teste em conjunto.....	63
Tabela 23. Resultados da contagem de pêlos e eventos mutacionais da primeira coleta em sete flores de Tradescantia clone 4430.....	65
Tabela 24. Resultados da contagem de pêlos e eventos mutacionais da segunda coleta em sete flores de Tradescantia clone 4430.....	66
Tabela 25. Leitura do número de eventos mutacionais induzidos em Tradescantia clone 4430 expostas no ponto localizado na Av. Silva Só esquina com Av. Ipiranga no bairro Petrópolis em Porto Alegre.....	67
Tabela 26. Estatística descritiva e matriz de correlação entre os resultados obtidos no teste de Ames com a linhagem TA100 e os obtidos em G. tigrina nas estações verão e inverno de 2000.....	91
Tabela 27. Estatística descritiva e matriz de correlação entre os resultados obtidos no teste de Ames com a linhagem TA98 e os obtidos em G. tigrina nas estações verão e inverno de 2000.....	92

I. INTRODUÇÃO

I.1. A Importância do Monitoramento *in Loco*

As condições ambientais são criadas por fatores físicos, químicos, biológicos e edáficos e sua interação num dado tempo e espaço. O ambiente sofre constantes mudanças, produzidas naturalmente pela interação com os seres vivos, pela interação desses seres entre si, e por atividades cósmicas e geofísicas. Mudanças detectáveis e mensuráveis no ambiente podem ser indicativas de estresse ou impacto ambiental. O estresse ambiental pode ser definido de acordo com o agente causador, que pode variar do estresse físico causado por erupções vulcânicas, tornados, etc. até a poluição, que ocorre quando um produto está presente no ambiente em concentrações suficientes para provocar efeitos tóxicos nos organismos, ultrapassando os limites de tolerância ecológica (Freedman, 1995). É importante salientar o fato de que a contaminação ambiental por agentes potencialmente tóxicos, não implica, necessariamente, em poluição. A poluição é uma possibilidade, que pode e deve ser avaliada através de alterações detectáveis nos ecossistemas e organismos testados.

O estudo da poluição ambiental em todos os seus aspectos requer especialistas das mais diversas áreas, ou seja, todas as pessoas interessadas, de uma maneira ou outra, na preservação do ambiente. Os escassos resultados de investigações epidemiológicas sobre poluentes impedem que limites confiáveis sejam fixados, e que medidas adequadas sejam tomadas. Exceto em casos muito especiais, métodos utilizados na toxicologia clássica não levam em conta os efeitos induzidos e produzidos a longo prazo. Estes efeitos produzidos pela poluição são essencialmente de três tipos:

- (1) o efeito teratogênico – no qual substâncias absorvidas em doses consideradas pouco tóxicas segundo critérios da toxicologia clássica podem agir preferencialmente no embrião, em momentos específicos do desenvolvimento, induzindo malformações (Moutschen, 1985);
- (2) o efeito carcinogênico – independentemente do efeito teratogênico, pequenas quantidades de substâncias que por elas mesmas não produziram efeitos tóxicos detectáveis, podem, eventualmente, desencadear uma cascata de eventos que podem promover o câncer;

- (3) e o efeito mutagênico – independentemente de qualquer atividade teratogênica ou carcinogênica, é o resultado deletério de qualquer agente que devido às suas propriedades químicas, físicas ou biológicas, em concentrações extraordinariamente pequenas pode induzir e produzir mudanças herdáveis em partes do sistema genético que exercem controle homeostático sobre células somáticas, determinando, desse modo, sua transformação maligna (Druckrey, 1973 cf. Ashby, 1995). A genotoxicidade, que é a capacidade de um agente de lesar o genoma, pode ser manifestada em mutações gênicas ou em mudanças na estrutura do conjunto cromossômico, as quais podem ser incorporadas à geração celular subsequente, e quando ocorre em células germinativas representa risco genético para a geração seguinte (Moutschen, 1985). As mutações são um processo inerente à própria condição do DNA, fazem parte da vida. A essência da biologia é mudança e evolução (Kirsch, 1993). Todos os seres vivos têm atravessado sua evolução sendo expostos a uma infinidade de genotóxicos naturais que estão nos alimentos e bebidas, pela inalação de fumaças e irradiações diversas do meio ambiente.

Poluentes ambientais, alguns dos quais são genotóxicos e carcinógenos bem conhecidos, podem se apresentar como moléculas inorgânicas simples ou em forma de substâncias orgânicas complexas. Alguns agentes podem agir como mutagênicos, que causam mutações pontuais, e outros podem agir como clastogênicos, os quais causam quebra cromossômica. Todos esses carcinógenos, mutagênicos e clastogênicos podem causar defeitos teratogênicos em embriões e fetos (Ma & Harris, 1985). A ação dos poluentes nas células-alvo pode causar desde simples danos fisiológicos à membrana, à transformação da célula, câncer e morte celular (Ma & Harris, 1985). A célula responde utilizando diferentes estratégias de ação, tais como: morte por citotoxicidade ou apoptose, modulação da expressão gênica controlando o ciclo celular, e reparação do material genético, de modo correto ou sujeito a erro, sendo o segundo responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação destes fatores que compõe a resposta a danos genéticos (Moustacchi, 2000). A ação dos poluentes que ocorre em nível celular é também verificada em níveis orgânicos, populacionais e ambientais. As contaminações acidentais por substâncias agudamente tóxicas são rapidamente detectadas no ambiente, permitindo o controle imediato da fonte emissora. No entanto, agentes que promovem toxicidade crônica levam muito tempo para serem identificados, afetando a sobrevivência, a reprodução, ou ainda, o patrimônio genético dos organismos expostos (Arnaiz, 1997).

Substâncias químicas, misturas complexas e radiações exercem um amplo espectro de atividades, variando de benéficas a neutras, deletérias e até letais. O café, por exemplo, inibe o dano genético causado sobre fetos em desenvolvimento, expostos a genotoxinas/carcinógenos potentemente ativos, através da placenta (Abraham, 1995). No entanto o café contém numerosos produtos potencialmente cancerígenos (Gold *et al.*, 1992), além da cafeína, que interfere na reparação do DNA, potencializando o efeito mutagênico de algumas substâncias.

Vários órgãos de regulamentação surgiram com o objetivo de avaliar criticamente as capacidades e limitações de testes de mutagenicidade como uma maneira de identificar carcinogênicos. A necessidade dessa avaliação foi estimulada pelo crescimento dos riscos relacionados à indução de câncer por agentes genotóxicos presentes no meio ambiente e em várias atividades profissionais modernas de risco (Santos-Mello & Cavalcante, 1992; Santos-Mello *et al.*, 1992; Silva & Santos-Mello, 1996). É importante identificar-se tais carcinógenos para poder estimar a sua capacidade de causar impactos à saúde humana e ao ambiente, a fim de que se possa montar uma estratégia eficiente para minimizar ou até anular os seus efeitos.

Consideráveis esforços têm sido empregados na identificação de mutagênicos químicos e físicos isolados, mas têm-se negligenciado a visão de que a poluição é um problema complexo, inter-relacionado e intrincado, de muitos fatores. Essa inter-relação não é só verdadeira em níveis globais, populacionais e individuais, mas também autêntica em nível celular. Por isso é importante investigar situações naturais. O monitoramento da genotoxicidade *in loco* é uma maneira de abordar tanto a mutagenicidade de um único poluente, como um grupo deles, numa dada condição ambiental. Isto porque tal monitoramento leva em conta fatores físicos, químicos e biológicos, e principalmente, vincula o efeito sinérgico dos mutagênicos, e mesmo dos não-mutagênicos, que podem contribuir para tal sinergismo. O monitoramento *in loco* do ar e da água de lugares de moradia e trabalho humano pode prover informação a respeito do nível de risco ou segurança em relação à mutagenicidade de cada local. Assim, medidas preventivas e reparadoras podem ser implementadas.

O monitoramento de um dado ponto ou conjunto de pontos pode informar a respeito de variações temporais, como aquelas devidas a diferenças sazonais, diurnas ou de biorritmo. O monitoramento em larga escala em uma dada área geográfica pode vir a traçar a origem ou o movimento dos mutágenos nesta área (Ma & Harris, 1985).

A avaliação de espécies expostas a genotóxicos no ambiente aquático e aéreo é complicada. Existem múltiplos poluentes potenciais que são freqüentemente encontrados como misturas complexas. Variações sazonais importantes ocorrem, por exemplo, nas

condições ambientais, estado hormonal e nutricional dos organismos, e é sabido que tais fatores podem ter uma influência dramática nos sistemas enzimáticos que ativam ou detoxificam genotóxicos. A avaliação da genotoxicidade em peixes ou em invertebrados aquáticos, em laboratório ou no meio, pode ser feita em nível molecular ou cromossômico. A intensidade do efeito dos agentes genotóxicos depende não só da quantidade a que um organismo é exposto, mas também do tamanho e espécie desse organismo, do seu estado nutricional, do método de exposição e de outros fatores relacionados. Assim, deve haver uma variação mensurável entre taxas e concentrações que não produzam efeitos detectáveis e aquelas que produzam efeito máximo. A observação de um efeito, seja ele benéfico ou prejudicial, complica-se pelo fato de que sistemas aparentemente homogêneos são na verdade heterogêneos. Mesmo dentro de uma mesma espécie, pode haver diferenças marcantes da resposta genotóxica entre diferentes indivíduos. Um efeito produzido em um indivíduo não será necessariamente repetido em outro. Assim, estimativas de significância do potencial genotóxico de um agente, devem envolver métodos estatísticos de avaliação, identificando ao máximo possível as variáveis e parâmetros utilizados (Zakrzewski, 1991).

As propriedades mutagênicas de amostras ambientais que representam misturas complexas podem ser avaliadas por testes *in vitro* e *in vivo*. Para testes com químicos *in vitro*, pode-se empregar o sistema xenobiótico de metabolização, que simula a metabolização realizada pelo fígado dos mamíferos. Sob determinadas condições fisiológicas e farmacocinéticas, os genotóxicos podem induzir mutações em células germinativas *in vivo* e assim, conduzir a desordens hereditárias. Druckrey (1973 cf. Ashby, 1995) já propunha que mutações em células somáticas poderiam estar associadas com o subsequente desenvolvimento de um câncer, e poderiam também ser responsáveis por algumas das doenças observadas no envelhecimento (Ames, 1989; Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines, 1993; Kirsch, 1993). Em mamíferos, a taxa de câncer específica para cada idade é inversamente correlacionada com o tempo de vida, embora fatores exógenos possam aumentar (por exemplo, o ato de fumar em humanos) ou diminuir sua incidência (por exemplo, restrição calórica em roedores). Há também correlação entre a taxa de envelhecimento e a taxa metabólica espécie-específica, o que parece implicar em processos endógenos no envelhecimento e no câncer. A recuperação dos tecidos somáticos, através da reparação do DNA, e as defesas contra mutagênicos endógenos e exógenos devem ser continuamente menores do que o requerido para uma sobrevivência indefinida, e mutações devem ser acumuladas com o tempo (Ames, 1989).

I.2. Descrição dos Sistemas de Monitoramento Usados

A versatilidade metabólica de um sistema *in vivo* justifica a prioridade experimental dada a este na detecção de genotoxicidade e carcinogenicidade. Claramente há diferenças na farmacocinética dos químicos entre sistemas como *Drosophila*, planárias, peixes e plantas, mas há possibilidades de extrapolação, tomando-se a devida cautela, entre esses sistemas e os mamíferos (Léonard *et al.*, 1982). Os testes devem ser selecionados pela sua sensibilidade na detecção da mutagenicidade e/ou carcinogenicidade potenciais e pela sua adequação aos tipos de amostras a serem testadas, de modo a prever e medir um possível impacto ambiental. Até que esse objetivo seja atingido, uma bateria de testes deve incluir tanta diversificação quanto possível: organismos-teste variando de fagos, bactérias, fungos *Drosophila* a mamíferos íntegros ou apenas células destes. As planárias e a *Tradescantia* estariam inseridas neste conjunto, com as vantagens do teste *in vivo*, com manutenção simples e barata em laboratório, e apresentando ainda a vantagem de poderem ser usadas em testes de genotoxicidade *in loco*. Nessa estratégia, dados de testes de genotoxicidade *in vivo* têm um papel central e testes *in vitro* desempenham uma função subsidiária, de suporte. Essa ênfase é reforçada pelo princípio toxicológico de que o prognóstico de dados de genotoxicidade de células somáticas *in vivo* (amplamente derivados de estudos com camundongos) para conseqüências toxicológicas adversas, seria, geralmente, mais seguro do que o prognóstico a partir de testes *in vitro* (Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines, 1993; Auletta *et al.*, 1993), devido às diferenças de metabolização. Muitos compostos podem necessitar ativação metabólica para demonstrar o efeito genotóxico (Legator & Ward Jr., 1991), e a ativação metabólica extrínseca, como aquela feita através da fração microssomal S9 do fígado de ratos, não reproduz necessariamente condições iguais às *in vivo*.

Os testes a serem utilizados serão apresentados em relação ao organismo usado, ao tipo de identificação do efeito biológico e vantagens para o monitoramento do ambiente. O teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* e o teste de Ames são técnicas de uso rotineiro em laboratórios de genotoxicidade. Já o teste Cometa está em fase de validação como método internacionalmente aceito para o monitoramento ambiental.

I.2.1. Planárias

Planária é o nome comum para vários gêneros deste turbelário de vida livre, pertencente à ordem Tricladida. O nome deste grupo está relacionado à forma característica

de sua cavidade digestiva, dividida em três ramos. A maioria das espécies varia de 0,32 a 2,54 cm, embora algumas formas gigantes tropicais cheguem a 60cm de comprimento. Embora as planárias possam ser encontradas em ambientes marinhos ou terrestres úmidos, a maioria é de água doce. Elas rastejam sobre uma camada de muco secretada por células epidérmicas especializadas. As formas menores movem-se através de cílios e as maiores por meio de contrações musculares. Células tácteis e quimiorreceptoras localizadas na epiderme servem como órgãos dos sentidos e na maioria das espécies estão agrupadas em aurículas, nos lados da cabeça. Possuem células pigmentadas sensíveis à luz formando ocelos ou olhos primitivos. Planárias são normalmente carnívoras ou necrófagas, portanto, consumidoras de 3ª ordem e concentradoras das substâncias presentes no meio, pois alimentam-se de microorganismos filtradores como cladóceros, rotíferos e outros componentes do zooplâncton e também de moluscos, anelídeos, ovos e larvas de insetos como mosquitos e borrachudos.

As maioria das planárias é hermafrodita, reproduz-se sexuadamente, realizando fecundação cruzada. No entanto, planárias semelhantes à *Girardia tigrina*, são muito estudadas em laboratório pela sua capacidade adicional de reprodução assexuada, por uma ruptura transversal do corpo (The Columbia Encyclopedia, 1993). O mesmo ocorre com algumas populações de *G. schubarti*. Os estudos sobre a reprodução destas planárias em nosso laboratório têm evidenciado que indivíduos com células diplóides reproduzem-se sexuadamente; e as triplóides (como é o caso de algumas *G. schubarti* e *G. tigrina*) ou mixoplóides (algumas populações de *G. schubarti*), reproduzem-se assexuadamente (Knakievicz, 1998).

G. tigrina ($2n=16$), *G. schubarti* ($2n=8$) e *G. schubarti* mixoplóide ($2n=8/3n=12$) são apenas algumas das espécies encontradas no Sul do Brasil (Kawakatsu *et al.*, 1976), mas foram escolhidas, dentre outras, como objetos do nosso estudo, pelo fato de serem facilmente encontradas na natureza em nosso Estado e adaptarem-se bem às condições de laboratório.

G. schubarti e *G. tigrina* são sensíveis a genotóxicos de referência, independentemente do modo de ação. Foi testada a sua sensibilidade genotóxica ao metil metanossulfonato (MMS), um clastogênico de ação direta sobre o DNA, à ciclofosfamida, uma substância dependente de metabolização para produzir mutações e à radiação γ , agente físico que causa quebras duplas e simples no DNA (Lau, 1998). A comparação de resultados esclarecerá sobre a possibilidade de sensibilidades diferentes entre tais espécies.

Não havia, até o momento, notícias do uso de planárias em testes de genotoxicidade. A única referência disponível é publicação do nosso próprio grupo de pesquisa. Guecheva *et al.* (2001) usaram planárias *G. schubarti* mixoplóides para avaliar o potencial genotóxico do

sulfato de cobre. Entretanto, planárias paludícolas têm sido utilizadas de modo disperso pelo mundo como indicadores da qualidade de águas e para avaliar o efeito tóxico de substâncias. Os tipos de análise são variados. Dessa forma, Best *et al.* (1981a; 1981b) investigaram respostas tóxicas agudas de clordane e metilmercúrio sobre *Dugesia dorotocephala*, e Best e Morita (1982) observaram respostas teratológicas de planárias *D. dorotocephala* íntegras e em regeneração a agentes teratogênicos específicos para mamíferos como mercúrio, actinomicina D, colchicina, colcemid, puromicina, etanol, cádmio e chumbo. Congiu *et al.* (1989) estudaram respostas tóxicas (mortalidade e frequência de fissão) de *Dugesia gonocephala* ao selênio e mercúrio. Nelson *et al.* (1994) verificaram a suscetibilidade de *Dugesia (G.) tigrina* a pesticidas e reguladores de crescimento para insetos (IGR_s) sob condições de campo, já que as planárias dessa espécie, juntamente com *D. dorotocephala*, são usadas como agentes biocontroladores de larvas de mosquitos. Mais recentemente, Raffa e Valdez (2001) expuseram planárias a doses crescentes de cocaína e verificaram que a súbita abstenção à droga causou uma diminuição na velocidade de locomoção dos animais. Nano *et al.* (2002) usaram um ensaio de toxicidade em planárias para avaliar a toxicidade de extratos aquosos de fungos usados como fitoterápicos. De Lucca *et al.* (2001) usaram *G. tigrina* para avaliar toxicidade aguda ao dicromato de potássio e um trabalho semelhante foi realizado anos antes por Preza (1995) aqui no Brasil. Também no Brasil, Sáfyadi (1993) empregou *G. tigrina* para avaliar o grau de degeneração, capacidade de reação ao toque e morte com desintegração do corpo após exposição aguda a compostos metálicos (mercúrio, cobre, cádmio, cromo e zinco).

Apesar do uso incipiente das planárias em testes de mutagenicidade, vários motivos tornam-nas especialmente recomendadas como organismos-teste para avaliações da genotoxicidade de substâncias e de amostras ambientais:

- I. elas têm uma grande capacidade de regeneração (Best *et al.*, 1968; Chandebouis, 1971; Baguña, 1975). A planária pode ser cortada em vários pedaços, assim, torna-se controle de si mesma, eliminando diferenças interindividuais que influenciam nas respostas aos tratamentos;
- II. as planárias possuem poucos cromossomos (*G. tigrina* tem $2n = 16$, *G. schubarti* $2n = 8$ e *G. schubarti* mixoplóide apresenta células $2n = 8$ e $3n = 12$) e o tecido em regeneração tem um alto índice mitótico (Best *et al.*, 1968; Baguña, 1975; Schürmann & Peter, 1998; Schürmann *et al.*, 1998). Os cromossomos são grandes e quase sempre todos os pares são identificáveis sem bandamento (Benazzi & Benazzi Lentati, 1976). Populações com

cariótipos diplóides apresentam reprodução sexuada. São hermafroditas, realizando fecundação sempre cruzada, o que mantém a variabilidade genética da população. A população mixoplóide apresenta reprodução exclusivamente assexuada (Baguña *et al.*, 1999; Alvarado, 2000a; 2000b);

- III. adaptam-se muito bem às condições de laboratório e seu cultivo é barato e fácil;
- IV. são altamente sensíveis a agentes genotóxicos e mostram resistência à toxicidade, sobrevivendo à indução de aberrações cromossômicas e quebras no DNA durante o tratamento com drogas e amostras ambientais de águas ou misturas complexas (Lau, 1998);
- V. as espécies selecionadas são facilmente encontradas na natureza, permitindo comparações dos resultados entre experimentos controlados de laboratório e avaliações feitas diretamente no ambiente (Marcus, 1946; Kawakatsu *et al.*, 1982);
- VI. são bioindicadoras naturais da qualidade da água. *G. tigrina* é relativamente resistente à poluição, sendo encontrada em águas paradas, pantanosas e às vezes poluídas, o que assegura sua sobrevivência para a realização dos testes, mas possui alta sensibilidade genotóxica. Já *G. schubarti* apresenta menor resistência à poluição em contrapartida a, possivelmente, uma maior sensibilidade genotóxica;
- VII. possuem capacidade de metabolizar substâncias complexas, o que é prioritário para a avaliação de amostras ambientais (Lau, 1998).

As planárias têm sido amplamente estudadas em nosso laboratório, devido às vantagens apresentadas, como novos organismos em testes de avaliação da genotoxicidade ambiental. Diante dos resultados obtidos até o momento, principalmente aqueles que se referem a sua grande sensibilidade genotóxica e capacidade de metabolização, continuaremos as pesquisas para acrescentar mais dados que comprovem a sua eficácia, para atingir o objetivo de validá-las como organismos internacionalmente aceitos para monitoramento ambiental. Os resultados, indubitavelmente positivos em todos os experimentos realizados até o momento, garantem o seu valor preditivo como organismos-

teste adequados para avaliações da genotoxicidade ambiental, especialmente para amostras de águas ou misturas complexas (Lau, 1998; Guecheva *et al.*, 2001).

1.2.2. *Tradescantia*

Plantas superiores são organismos utilizados mundialmente para biomonitoramento ambiental. Tem-se acumulado uma ampla bibliografia sobre testes de genotoxicidade e mutagenicidade em plantas. Existem grupos de pesquisa dispersos pelo mundo que desenvolvem especificamente pesquisas com plantas para o monitoramento ambiental. Um exemplo é o "International Program on Plant bioassays" (IPPB). Este grupo tem como objetivo o uso de bioensaios em plantas para testar ou monitorar mutagênicos e carcinogênicos ambientais no ar, água e solo. O seu objetivo é manter a qualidade desses elementos essenciais à vida e usar indicadores simples de poluição ambiental como instrumento de educação ambiental para o público em geral (Ma, 1999). Outro desses grupos é o EuroBionet, the 'European Network for the Assessment of Air Quality by the Use of Bioindicator Plants'. Esta é uma cooperativa formada de autoridades públicas e científicas de doze cidades em oito países. Num único trabalho usaram as plantas bioindicadoras *Nicotiana tabacum* Bel W3, *Populus nigra* Brandaris, *Tradescantia* sp. clone 4430, *Lolium multiflorum italicum* e *Brassica oleracea acephala* em 90 pontos de monitoramento, avaliando danos visíveis, parâmetros de crescimento e medindo o acúmulo de substâncias tóxicas nas suas folhas (Klump *et al.*, 2002).

A *Tradescantia* é uma planta superior conhecida por ser altamente sensível a mutagênicos e adequada para o monitoramento *in loco*. Em 1930 *T. paludosa* começou a ser usada para estudos de aberrações cromossômicas e em 1950 iniciou-se o seu emprego no monitoramento *in loco* para detecção de efeitos da radiação sobre os cromossomos (revisão em Ma & Harris, 1985). A *Tradescantia* clone 4430 é híbrida entre *T. subacaulis* e *T. hirsutiflora* e possui $2n=12$. Ela possui poucas ramificações, com pêlos muito longos cobrindo a superfície das folhas e hastes. As inflorescências jovens, do tipo cimeira, são formadas por 16 a 20 botões. As flores, azuis no clone 4430, sob condições naturais florescem no verão e no início do outono (Ma, 1982), mas podem ser induzidas o ano todo se suplementadas com luz artificial, perfazendo um ciclo total de 17 horas de luz por dia (Rodrigues *et al.*, 1998). As plantas mantêm a altura entre 40 e 60 cm quando cultivadas em potes plásticos, e devem ser mantidas apenas 6 a 8 hastes em desenvolvimento por pote, para manter e/ou aumentar a produção de flores. A exposição às amostras ambientais em laboratório ou *in loco* pode ser feita através dos chamados 'cuttings', que são cortes das hastes que contém as inflorescências. É necessária uma população de cerca de 500 vasos para obter-se no mínimo

200 cortes de plantas em excelentes condições para teste, a cada duas semanas. As inflorescências não usadas para testes devem ser coletadas, para que outras novas se desenvolvam (Rodrigues *et al.*, 1998). A *Tradescantia* é um organismo internacionalmente aceito para monitoramento ambiental. É usada para avaliar a mutagenicidade de águas, ar e solos. Em São Paulo foi estudada a clastogenicidade dos extratos de material particulado de amostras de ar em teste de micronúcleos com uma cultivar comum em jardins, *Tradescantia pallida* cv. *purpurea*, que mostrou sensibilidade semelhante aos clones 4430 ou 03, padrões para o biomonitoramento ambiental (Batalha *et al.*, 1999). O mesmo grupo de pesquisa, da Universidade de São Paulo, realizou testes de monitoramento *in situ* para avaliar a poluição do ar próxima a um incinerador de dejetos sólidos utilizando o teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* (Ferreira *et al.*, 2000).

As plantas têm, em geral, vantagens para estudos de mutagênicos ambientais, e *Tradescantia* possuem características que as fazem especialmente adequadas ao monitoramento *in loco*. Estas características são (Ma & Harris, 1985):

- I. cromossomos eucarióticos grandes em tamanho e em pequeno número, com $2n = 12$;
- II. genes marcadores de mutações pontuais, como a mutação gênica identificada por células cor-de-rosa nos pêlos estaminais do clone 4430;
- III. portáteis através dos seus cortes, podendo ser facilmente transportadas e manipuladas nos locais de exposição;
- IV. capacidade de metabolização que permite transformar pró-mutagênicos em mutagênicos efetivos, portanto adequadas para a avaliação de misturas complexas (Rodrigues *et al.*, 1998) e,
- V. adequadas para o monitoramento de qualquer ambiente, seja ele, aquático, aéreo ou terrestre.

Os testes a serem realizados nos organismos relacionados acima podem ser divididos em duas categorias. São elas: teste de genotoxicidade e testes de mutação gênica.

I.3. O Teste Cometa

O teste Cometa é um teste de genotoxicidade que detecta danos primários causados no DNA do tipo quebras de fita única, diretas ou induzidas por lesões, cujo procedimento do ensaio na sua versão alcalina torna essas anomalias lesões alcalilábeis detectáveis (Green *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995b; Speit, Com. Pessoal 1996). Portanto, é indicativo de mutagenicidade, já que tais lesões podem sofrer reparação. Apresenta as vantagens de ser simples, rápido, sensível e de baixo custo. Fornece resultados em nível de células individuais, sendo necessárias amostras celulares extremamente pequenas. Uma das vantagens do teste Cometa é que pode ser usado para mensurar quebras de DNA em quaisquer tipos de células eucariotas, não necessariamente em proliferação, sendo necessária apenas uma boa suspensão celular (Green *et al.*, 1992; Betti *et al.*, 1994; Ribas *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1995; Tice, 1995b; Tice *et al.*, 1996). É crescente a utilização do teste em animais *in vivo* (Pool-Zobel *et al.*, 1993; Verschaeve & Gilles, 1995; Ralph *et al.*, 1996; Kreja *et al.*, 1996; Salagovic *et al.*, 1996; Tuo *et al.*, 1996) em órgãos-alvo específicos (Pool-Zobel *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1997). Tem uma aplicação potencialmente ampla em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, em estudos de dano e reparo no DNA e biomonitoramento humano e ambiental (revisões em Cotelle & Férard, 1999; Tice *et al.* 2000).

O teste consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células lisadas sob condições alcalinas e embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas para microscopia. Após a coloração com brometo de etídio, os núcleos intactos são redondos. Já nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma "cauda" de fragmentos sedimentados, semelhante a um Cometa (Green *et al.*, 1992; McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Olive *et al.*, 1993). Quanto maior o dano no DNA, maior será esta cauda do Cometa. O teste detecta danos ao DNA do tipo quebras de fita única (SSB_s - Simple Strand Breaks), diretas ou induzidas por lesões como metilação e adutos, cujo procedimento torna essas anomalias lesões alcalilábeis, detectadas sob as condições do ensaio na sua versão alcalina (Green *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995b; Speit, 1996b). Em contrapartida os indutores de ligações cruzadas, por exemplo a ciclofosfamida, são menos detectados, provavelmente por estabilizarem a cromatina. No entanto, a partir de alterações nos parâmetros do teste sugeridas por Merk & Speit (1999), as ligações cruzadas são detectadas, observando-se um claro decréscimo na migração de DNA induzido por radiação γ . Hartmann e Speit (1997) propuseram um protocolo para distinguir-se genotoxicidade e citotoxicidade. A reparação do DNA tem um efeito complicador sobre os resultados do teste Cometa, pois elimina rapidamente as lesões limitando a

persistência dos efeitos dos mutágenos e por outro lado torna detectáveis os adutos, que são induzidos pelos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, devido principalmente às quebras causadas no processo de excisão. Por outro lado, o sistema de reparação elimina rapidamente as lesões, limitando a persistência dos efeitos dos mutágenos. Os metais, que agem restringindo a reparação, podem reforçar a detecção de danos ao DNA. Certas lesões ao DNA, como o dano oxidativo nas bases, normalmente não são detectados no protocolo padrão do teste Cometa, mas, tornam-se detectáveis quando são adicionadas enzimas de reparação do DNA ao sistema (Speit & Hartmann, 1996).

Estudos *in vivo* com controles positivos e negativos têm demonstrado que, em função da variabilidade dos resultados, é necessário que o obtido com populações em teste seja sempre comparado com o nível básico dos controles negativos, assim, pode-se ou não validar a resposta positiva, e caracterizar o risco genotóxico. Ainda são necessárias mais informações sobre a variabilidade das medidas e sobre a influência de possíveis fatores que possam alterar os resultados (Speit & Hartmann, 1996).

A análise dos resultados pode ser feita de forma sofisticada, usando-se um sistema de análise de imagens (O'Neill *et al.*, 1993; Pool-Zobel *et al.*, 1994; Monteith & Vanstone, 1995; Kreja *et al.*, 1996; Salagovic *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997). Pode-se proceder ainda a análise de forma bastante simples, com medidas das células através de uma lente ocular com escala (Betti *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1995; Ribas *et al.*, 1995; Pandrangi *et al.*, 1995; Verschaeve & Gilles, 1995; Rojas *et al.*, 1996; Ralph *et al.*, 1996; Tuo *et al.*, 1996); ou ainda através da avaliação visual das classes de dano (de 0 - sem dano, a IV - dano máximo), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (Collins *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994a). Olive *et al.* (1993) e Fairbairn *et al.* (1995) sugerem que, além dessas classes, pode-se identificar apoptose celular, caracterizada pela separação radical entre a cabeça e a cauda do Cometa. Através da identificação dos diferentes níveis de dano ao DNA sofridos pelas células, pode-se obter informação sobre eventuais intensidades diferentes de danos, sofridos por subpopulações celulares específicas (Speit & Hartmann, 1996). Todos esses métodos citados são aceitos em publicações (Ross *et al.*, 1995; Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995b; Speit, 1996b; Cotelle & Féraud, 1999; Tice, 2000).

O teste Cometa tem sido usado na avaliação da amplitude dos danos ao DNA (Pool-Zobel *et al.*, 1993) por causa da sua crescente aceitação como um novo teste de genotoxicidade (McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995) e habilidade em detectar danos, em concordância com outros métodos de avaliação da genotoxicidade induzida (Monteith & Vanstone, 1995), dependendo do agente testado e de seu modo de ação (Anderson *et al.*, 1997). Tem sido amplamente usado para o monitoramento ambiental

(Tice, 1995a; Salagovic *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000), na avaliação de quebras no DNA em organismos aquáticos (Mitchelmore & Chipman, 1998; Guecheva *et al.*, 2001). Este teste foi aplicado nas planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* diplóide e *G. schubarti* mixoplóide.

I.4. Testes de Mutação Gênica

Os testes de mutação gênica usados foram o teste de avaliação de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* (Trad-SHM), e o teste de Ames ou ensaio *Salmonella*/microsossoma, realizado por outra pesquisadora, cujos resultados foram comparados com os nossos.

I.4.1. O Teste de Ames ou ensaio de *Salmonella*/microsossoma

Trata-se de um teste rápido e seguro, apesar de ter um custo relativamente alto quando comparado aos demais testes usados neste trabalho. Um grande banco de dados tem sido acumulado com este ensaio, confirmando sua capacidade para detecção de compostos geneticamente ativos com uma eficiência de cerca de 80%. É o teste mais empregado na avaliação da segurança de produtos, substâncias e amostras líquidas (Vargas, 1992; Henriques, 1987).

O objetivo do ensaio de *Salmonella*/microsossoma é avaliar o potencial mutagênico de um produto específico pelo seu efeito sobre uma ou mais linhagens de *Salmonella* auxotrófica para o aminoácido histidina.

Linhagens de *Salmonella typhimurium* foram construídas com o objetivo de detectar diferentes tipos de ação mutagênica, possuindo também mutações e plasmídeos capazes de aumentar sua sensibilidade. Para que a avaliação da mutagênese seja mais ampla, utiliza-se um conjunto de linhagens, cada uma delas contendo um tipo diferente de mutação no operon da Histidina.

Quando as linhagens de *Salmonella* são expostas a um agente mutagênico, algumas das bactérias na população tratada sofrem mudanças genéticas através de interação química com o produto que está sendo testado. Quando estas mudanças ocorrem no gene da histidina (anteriormente mutado), a bactéria reverte de seu estado auxotrófico para o aminoácido histidina para o estado prototrófico e, conseqüentemente, passa a ser capaz de crescer em um meio de cultura onde não existe histidina adicionada.

Diferentes linhagens testadoras são usadas porque cada uma delas pode ser mutada por uma determinada classe de agente mutagênico. Um composto que é mutagênico para uma linhagem não é necessariamente para outra (Vargas, 1992; Henriques, 1987; Le

Curieux *et al.*, 1993; Bernacchi *et al.*, 1996). Neste trabalho, foram usadas as linhagens TA100 e TA98 de *S. typhimurium*.

A linhagem TA98 detecta mutagênicos que causam defasagem no quadro de leitura do DNA (*frameshift mutation*) e a linhagem TA100 detecta mutagênicos que causam substituição de pares de base do DNA (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

Em testes com procaríotos, um componente importante é a fração microsossomal S9, um sistema enzimático xenobiótico de metabolização de substâncias. Este sistema enzimático é extraído de células de fígado de ratos e tem a função de mimetizar o metabolismo de mamíferos nas bactérias. A função primária deste sistema Microsossomal é proteger a célula, degradando fisiologicamente substâncias inerentes ao metabolismo celular e detoxificando substâncias estranhas à célula. Porém, algumas substâncias inativas quando em contato direto com a célula (pró-mutagênicos), podem se tornar mutágenos efetivos por ação da fração S9, permitindo que seja avaliada a ação genotóxica dos metabólitos dos agentes testados (Crosby, 1998; Mortelmans & Zeiger, 2000).

I.4.2. O Trad-SHM

O Trad-SHM é simples, relativamente rápido (dura de 11 a 14 dias) e adequado para experimentos em laboratório ou *in loco*. As principais células neste ensaio são as células mitóticas dos pêlos estaminais que se desenvolvem nos botões de flor jovens. O ensaio é baseado no fato de que estas células do clone 4430 são heterozigotas para cor de flor, com um marcador fenotípico visível que muda a pigmentação de azul (dominante) para rosa (recessivo). Assim, as mutações no alelo azul irão produzir uma célula recessiva rosa entre as células azuis, num único evento mutacional. Tendo ocorrido uma mutação rosa, a célula pode continuar se dividindo, dando razão à uma série contígua de células rosa. Tal série de células rosa delimitada por células azuis em um pêlo estaminal são também consideradas um único evento mutacional. Um pêlo estaminal que possui duas células rosa separadas por uma ou mais células azuis é considerado como tendo sofrido dois eventos mutacionais. Este ensaio tem sido usado para o estudo dos efeitos genéticos induzidos por radiação, agentes mutagênicos presentes no ar e compostos orgânicos voláteis, agentes químicos em forma líquida, sedimento, amostras de solo, fumaça de máquinas, monitoramento *in loco* de águas e efluentes aquáticos (revisão em Ma *et al.*, 1994).

I.5. Dimensão do Problema

Com dimensões continentais e 70% da população concentrada em áreas urbanas, o Brasil é o país em desenvolvimento que mais tem atraído a atenção internacional. A poluição e o desmatamento ameaçam o equilíbrio ambiental de seus diversificados ecossistemas, inclusive o de maior biodiversidade do planeta, o amazônico.

O agravamento dos problemas ambientais no país está ligado à industrialização, iniciada na década de 50, ao modelo agrícola monocultor e exportador instituído desde os anos 70, à urbanização acelerada e à desigualdade socioeconômica. Nas grandes cidades, dejetos humanos e resíduos industriais saturam a deficiente rede de saneamento básico e envenenam águas e solos. Gases liberados por veículos e fábricas, além das queimadas no interior, poluem a atmosfera. Todos os processos de combustão, incluindo o cigarro, costumam produzir uma grande quantidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, por isso estes compostos são um dos grandes problemas ambientais decorrentes do modelo de sociedade moderna (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RGS – Pró Guaíba, 1998).

I.5.1. A Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba

A bacia hidrográfica do Lago Guaíba, situada no estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil, é a mais importante do Estado, sendo formada por 8 sub-bacias (Guaíba, Gravataí, Sinos, Cai, Taquarí-Antas, Alto Jacuí, Vacacaí e Pardo/Baixo Jacuí), em cuja a área moram aproximadamente de 5,9 milhões de habitantes, em 251 municípios dos 497 existentes no Estado.

As águas da bacia do Lago Guaíba são utilizadas como fonte de abastecimento para cerca de 1 milhão de habitantes (97% da população de Porto Alegre), e são uma importante via de navegação, pois ligam o centro do estado ao porto de Rio Grande. São ainda utilizadas para recreação, pesca, irrigação, habitat de espécies, fonte de lazer, turismo e harmonia paisagística (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RGS – Pró Guaíba, 1998).

Estão localizadas na área dessa bacia 8.236 indústrias (Pró-Guaíba/Fepam, 1997). Muitas destas indústrias são representantes dos principais setores produtivos do Estado: siderurgia, refinaria de petróleo, indústrias de cimento, papel, celulose, petroquímica, extração carbonífera, lavouras de exportação, setor coureiro-calçadista e metal-mecânico (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RS – Pró Guaíba, 1998). Esses setores são responsáveis por 86% do PIB do Rio Grande do Sul e 6,54% do PIB do Brasil. Em suas

margens ainda estão presentes zonas de agricultura intensiva e regiões urbanas incluindo a região metropolitana da capital, Porto Alegre.

A bacia do Guaíba tem representados em suas margens os principais ecossistemas do Rio Grande do Sul e concentra 28 unidades de conservação da natureza. Dentre estas podemos salientar a Reserva da Serra Geral, que abriga uma significativa mostra da mata atlântica, o Arquipélago do Delta do Jacuí, que abriga uma enorme diversidade de espécies, e o Parque de Itapuã, composto por um mosaico de ecossistemas que incluem campos, areias, restingas, ilhas, praias e morros, que servem de refúgio para diversas espécies, estando muitas delas em extinção (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RGS – Pró Guaíba, 1998).

I.5.2. O Projeto Pró-Guaíba

No estado do Rio Grande do Sul o projeto Pró-Guaíba adotou uma dinâmica de planejamento concebida a partir de diagnósticos que evidenciaram as necessidades da execução de obras de caráter emergencial, além de propor formas de intervenção através da formulação de planos que visam o desenvolvimento racional, incentivando uma nova postura da administração pública e das populações urbanas e rurais que vivem da bacia hidrográfica do Guaíba. Os diagnósticos realizados para as áreas urbanas e rurais da bacia, a partir das informações de diversas instituições estaduais e municipais, revelaram a existência de situações de poluição ambiental generalizada em todas as sub-bacias. Nas áreas urbanas os problemas estão mais concentrados nos municípios de maior população e industrialização, refletindo a falta de esgotos sanitários, especialmente nas sub-bacias do Guaíba, Gravataí e Sinos; a necessidade de ampliar os tratamentos de despejos gerais de natureza industrial, especialmente nas sub-bacias do Baixo e Médio Jacuí, Sinos, Gravataí, Caí e Guaíba; a necessidade de ampliar e melhorar os serviços de coleta, tratamento, e disposição final de resíduos sólidos, especialmente nas sub-bacias do Guaíba, Gravataí, Sinos e Baixo Jacuí. Nas áreas rurais, as questões mais críticas referem-se à erosão, desmatamentos, assoreamento de cursos d'água e a contaminação por agrotóxicos e resíduos orgânicos. Esses problemas acarretam graves reflexos sobre o solo, flora, fauna, ar e água. Essa situação ocorre em toda a Bacia do Guaíba (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RGS – Pró Guaíba, 1998).

Além de ações de controle de poluição ambiental, verificou-se a necessidade de recuperar, manter, e ampliar as ações de monitoramento das águas e do ar nas áreas mais comprometidas. O projeto Rede de Monitoramento Ambiental, compreendido pelo programa, visa acompanhar a evolução da qualidade ambiental e levantar indicadores de degradação do meio ambiente, e desenvolve subprojetos como: medição e avaliação da qualidade e

quantidade da água dos rios formadores do Guaíba, e monitoramento do ar e parâmetros meteorológicos, especialmente na Região Metropolitana de Porto Alegre.

A Rede de Monitoramento Ambiental já está atuando dentro do programa Pró-Guaíba, realizando avaliações de parâmetros relacionados à toxicidade, através do DMAE (Departamento Municipal de Água e Esgotos) e FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental). O DMAE está fazendo coletas de água em pontos determinados, e realiza o monitoramento dos parâmetros cor, alcalinidade, dureza, nitrito, nitrato, alumínio, bário, ferro total, manganês, coliformes totais e plâncton. Nos pontos de captação são determinados um maior número de parâmetros, além desses já citados. Na estação 31, foz do Rio Gravataí, ponto de monitoramento considerado como prioritário pelo programa Pró-Guaíba, além dos parâmetros já citados, são monitorados a transparência, profundidade, temperatura do ar e da água, pH, oxigênio dissolvido, condutividade, DBO₅, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, turbidez, fosfato orto e total, resíduo total, cádmio, chumbo, cobre, cromo total, mercúrio, níquel, zinco, cloreto, fenóis, surfactantes e coliformes fecais.

As águas da bacia do Guaíba foram classificadas pelo DMAE (Departamento Municipal de Águas e Esgoto) utilizando um índice denominado IQA (Índice de Qualidade de Água). O IQA é uma forma simplificada de apresentação das condições da qualidade da água (**Tabela 1**). O cálculo é feito a partir dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD), coliformes fecais, pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), fosfato total, nitrato, turbidez e sólidos totais. O IQA enquadra as águas nas seguintes faixas: MUITO RUIM (0 – 25); RUIM (26 – 50); REGULAR (51 – 70); BOM (71 – 90) e EXCELENTE (91 – 100) (Bendati *et al.*, 2000). É importante mencionar que cada corpo d'água formador do Lago Guaíba apresentou uma classificação própria (Bendati *et al.*, 2000), conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificações do Guaíba e dos seus principais afluentes através do IQA, segundo o Departamento Municipal de Águas e Esgotos (DMAE).

Corpos d'água	Índice de Qualidade de Água (IQA)
Rio Gravataí	entre muito ruim e ruim
Rio dos Sinos	entre regular e ruim
Rio Cai	melhor qualidade dos formadores do Guaíba
Rio Jacuí	melhor qualidade dos formadores do Guaíba
Arroio Dilúvio	entre muito ruim e ruim
Lago Guaíba (próximo ao Dilúvio)	entre regular e ruim

É possível observar diferenças na qualidade das águas das diferentes regiões, o que está relacionado com as interferências que estes cursos hídricos sofrem ao longo de seus percursos, sendo aqueles contaminados por uma maior atividade industrial e urbana, os mais prejudicados.

Buscando uma avaliação mais completa do que a exigida pela legislação vigente, o potencial mutagênico das águas e sedimentos da bacia do Lago Guaíba vem sendo avaliado e monitorado em diversos estudos realizados por vários pesquisadores da UFRGS. Como exemplos de testes de mutação cromossômica, podemos citar os trabalhos de: Lemos (1998), que realizou o estudo genotóxico de amostras do Rio Caí através de testes de micronúcleos em eritrócitos de peixes e de humanos, e troca entre cromátides-irmãs (SCE) em células humanas; Gimmler-Luz *et al.* (1992), que fizeram análise de aberrações cromossômicas em camundongos tratados com água de beber das estações de coleta do DMAE em Porto Alegre; Prof. Bernardo Erdtmann e bolsistas de iniciação científica, que realizaram teste de micronúcleos em peixes submetidos à exposição crônica a amostras de águas, e efluentes brutos e tratados lançados no Guaíba, e teste de micronúcleos e anomalias em mitose em *Allium cepa* tratadas com amostras de água do Guaíba (El Jundi & Erdtmann, 1995, dados não-publicados). Lemos *et al.* (1994) avaliaram as águas superficiais do rio Caí, utilizando o teste de Ames, por método direto e concentrando as amostras. Nestes estudos foi possível delimitar a área de influência do complexo industrial do Pólo Petroquímico sobre a mutagenicidade deste rio, perto dos locais de liberação de efluentes. A obtenção de resultados positivos em águas tomadas como controle negativo foi atribuída à provável presença de pesticidas que escoam das lavouras situadas às margens do rio Caí. A influência do Pólo Petroquímico também foi verificada através do teste de trocas entre cromátides-irmãs (SCE) (Lemos *et al.*, 1994) e análise da frequência de micronúcleos (Lemos e Erdtmann, 2000) em linfócitos humanos. Empregando o teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster* (SMART), Silva (2000) observou que a genotoxicidade detectada no rio Caí também está associada à influência da liberação de efluentes urbanos.

Mais recentemente, Vargas *et al.* (2001) mostraram que as águas superficiais e intersticiais do rio dos Sinos não apresentam resposta mutagênica positiva com o teste *de Ames*, no entanto, encontraram resultados genotóxicos positivos em amostras de água e sedimento deste rio, com o teste de Microtriagem por indução Lisogênica.

Quanto ao Lago Guaíba, as amostras de água superficial avaliadas através do teste de aberrações cromossômicas em medula de camundongos (Guimmler-Luz *et al.*, 1992), não induziram mutações cromossômicas nos organismos-teste. Entretanto, amostras de sedimentos analisadas pelo teste de Ames com a linhagem TA98 apresentaram resposta

mutagênica positiva na ausência de ativação metabólica, em pontos de coleta próximos a locais de liberação de esgoto urbano (Rolla & Henriques, 1997).

O monitoramento da qualidade do ar é realizado pela Rede de Monitoramento Ambiental do projeto Pró-Guaíba através da FEPAM, DMAE e Instituto de Ecologia da UFRGS, avaliando semanalmente os parâmetros CO₂ e material particulado total através de unidades de captação localizadas em locais de intenso fluxo de veículos automotores e emissões de indústrias. A coleta de tais parâmetros poderia contribuir para o nosso propósito de implantar testes de monitoramento do ar *in loco* em Porto Alegre. A análise de micronúcleos e o teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* podem ser padronizados e implementados no monitoramento da qualidade do ar, semelhantemente ao que está sendo feito em São Paulo (Ma, Rodrigues & Saldiva, 1998; Batalha *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000).

Como propósito deste trabalho, pretendemos auxiliar a Rede de Monitoramento Ambiental atuando no monitoramento *in loco* da genotoxicidade da poluição urbana de Porto Alegre através do teste Cometa em planárias e teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia*. A realização de testes de mutagenicidade contribui na avaliação dos possíveis efeitos desastrosos sobre a biota. Cabe citar que os testes *in vivo* são os mais decisivos e recomendados na literatura internacional (Ashby, 1991; Legator & Ward Jr., 1991; Auletta *et al.*, 1993; Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines, 1993).

Estudos da genotoxicidade através do monitoramento *in loco*, poderão contribuir significativamente para a definição do risco de impacto biológico que estas áreas vêm sofrendo, ajudando na priorização de investimentos para a melhora da qualidade de vida na cidade de Porto Alegre.

Monitorar o ambiente é absolutamente essencial para identificarmos perigos para a saúde humana e a biota, avaliar métodos de descontaminação do ambiente, e prevenir que não ocorram mais degradações aos ecossistemas (Butterworth, 1995).

I.6. OBJETIVOS

1. Monitoramento do potencial genotóxico das águas de oito pontos selecionados da bacia do Guaíba localizados na região metropolitana de Porto Alegre - RS durante dois anos, através do teste Cometa em planárias *G. tigrina*;
2. Comparação da sensibilidade genotóxica das planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* linhagem mixoplóide no teste Cometa em amostras coletadas em duas estações do ano;
3. Comparação dos dados obtidos no teste Cometa em planárias com os obtidos no teste de reversão gênica em *S. typhimurium* linhagens TA100 e TA98 para quatro pontos e duas estações do ano na bacia do Guaíba;
4. Verificar se há variações sazonais significativas no potencial genotóxico das amostras de águas da bacia do Guaíba;
5. Correlacionar os dados obtidos nos testes de genotoxicidade com os parâmetros de análise da qualidade das águas coletados pelo DMAE nos pontos de monitoramento selecionados;
6. Realização de testes piloto para padronização do monitoramento do ar *in loco* através do teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia*.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Durante dois anos, foram monitoradas as águas da bacia hidrográfica do Guaíba, em diferentes pontos, desde o verão de 1999/2000 até a primavera de 2001, na área da Grande Porto Alegre. Foram utilizadas planárias como organismo-teste e o teste Cometa para se avaliar a genotoxicidade de amostras de águas. Todas as amostras foram testadas usando-se planárias da espécie *G. tigrina*. Em duas amostragens (verão 2000/2001 e inverno 2001), foram empregados três grupos de planárias: *G. tigrina*, *G. schubarti*, e *G. schubarti* mixoplóide (2n/3n), para se avaliar a sensibilidade entre os três grupos. As planárias *G. schubarti* linhagem mixoplóide, que possuem células diplóides (2n=8) e triplóides (3n=12), foram testadas quanto à adequação ao teste Cometa. Se uma espécie responde de maneira dependente de dose quando submetida a concentrações crescentes de um mutagênico conhecido, está assegurado o seu uso para avaliação de amostras ambientais complexas. Estas mesmas curvas de sensibilidade já foram obtidas para *G. tigrina* e *G. schubarti* diplóide em trabalhos anteriores (Lau, 1998).

II.1. Curva de Sensibilidade de *G. schubarti* Mixoplóide Determinada a Partir do Teste Cometa

Para obter-se tal curva de sensibilidade expôs-se dez planárias *G. schubarti* mixoplóides durante 5 horas à água de cultivo deionizada e reconstituída como controle negativo, e a doses crescentes do clastogênico de ação direta Metil Metanossulfonato (MMS) C.A.S. [66-27-3] (\cong 99% de pureza) do laboratório Sigma dissolvido na mesma água de cultivo, em concentrações finais relacionadas na tabela abaixo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Controle negativo e doses de MMS usadas para obter-se a curva de sensibilidade de *G. schubarti* mixoplóide.

DOSE DE MMS (X 10 ⁻² mM)
0 (C-)
4
6
8
12
16
24
32

Os resultados foram avaliados pelo teste Cometa. O teste estatístico realizado foi a correlação de Pearson (r). A partir deste experimento determinou-se a dose de 16×10^{-2} mM MMS como adequada para o experimento de avaliação de permanência da resposta positiva em *G. schubarti* mixoplóide.

II.2. Experimento de Avaliação da Permanência do Dano no DNA de *G. schubarti* Mixoplóide Após Exposição ao Clastogênico MMS

Foram expostas oitenta planárias *G. schubarti* mixoplóides a água deionizada e reconstituída como controle negativo e a 16×10^{-2} mM MMS durante cinco horas para avaliação da permanência da resposta positiva e capacidade de reparação de danos no decorrer dos tempos em horas (h) relacionados na tabela abaixo (**Tabela 3**).

Tabela 3. Tempo de reparação em *G. schubarti* mixoplóide após exposição ao MMS.

TEMPO DE REPARAÇÃO (h) APÓS EXPOSIÇÃO AO MMS
0
2
4
8
12
18
24
48

Após decorridas as cinco horas de exposição ao clastogênico as planárias foram colocadas em água deionizada reconstituída até completar o tempo de reparação previsto. O resultado do controle negativo foi obtido por uma média de três lâminas obtidas de animais não tratados (**Tabela 6**). O experimento foi avaliado a partir do teste Cometa.

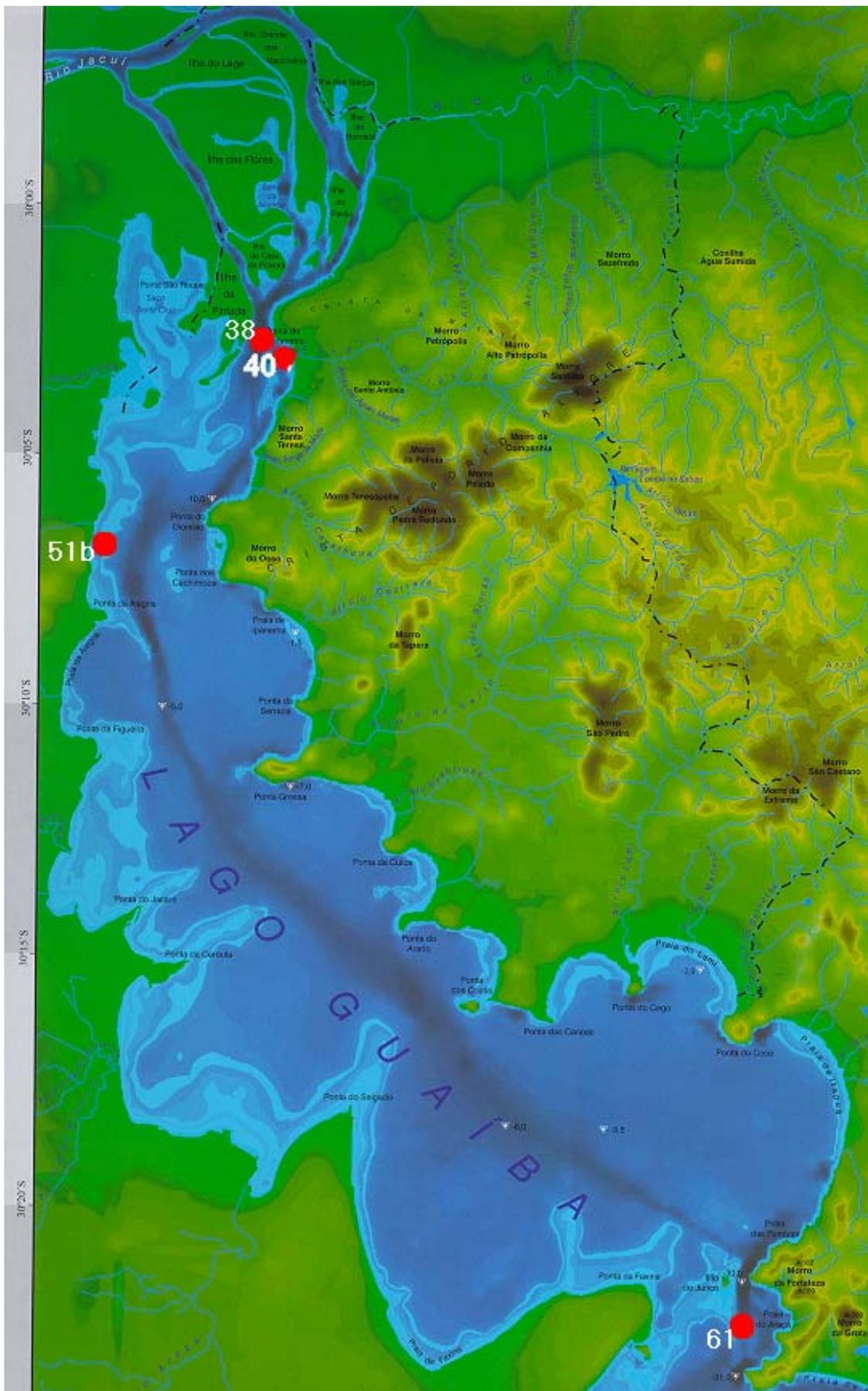


Figura 2. Mapa da localização dos pontos no Guaíba.

Os pontos selecionados foram a estação 31, foz do Rio Gravataí, definida como prioritária para o programa Pró-Guaíba, a estação 57, foz do Rio Jacuí, estação 58, foz do Rio Caí, e 59, foz do Rio dos Sinos, para uma avaliação prévia da contribuição dos afluentes para a poluição da Bacia do Guaíba (Fig. 1). Dos pontos monitorados pelo DMAE no Guaíba (Fig. 2) selecionamos a estação 38, Ponta da Cadeia, por ser um ponto de emissão subaquática de poluição urbana (Atlas Ambiental de Porto Alegre, 1998), estação 51b, que recebe efluentes da Riocell, estação 61, foz do Guaíba, próxima à Lagoa dos Patos e a estação 40, saída do Arroio Dilúvio, que é uma área onde foi constatado um grande impacto ambiental (Atlas Ambiental de Porto Alegre, 1998).

II.3.1.1. Amostragem *in Loco*

As amostras de água são coletadas através de sifão a 1,20 m da superfície e acondicionadas em garrafas plásticas atóxicas. A amostragem é sempre realizada no segundo mês da estação do ano amostrada. Chega-se aos pontos em lancha, e sempre a mesma equipe do DMAE faz as coletas de todas as amostras, para que a amostragem seja realizada sempre no mesmo local dentro da área abrangida pelo ponto. Os pontos são localizados através de bóias e referências físicas em relação às margens esquerda e direita do Guaíba e afluentes. Os parâmetros temperatura da água com termômetro digital e transparência através de disco de Secchi são coletados *in loco*. As coletas foram todas acompanhadas pela pesquisadora e/ou bolsista de iniciação científica. As amostras foram estocadas em câmara fria a 4°C.

II.3.1.2. Monitoramento da Bacia Hidrográfica do Guaíba

II.3.1.2.1. Teste Cometa em *G. tigrina*

O teste Cometa em planárias da espécie *G. tigrina* foi realizado em todas as amostras coletadas na bacia do Guaíba para monitoramento de atividade genotóxica. Foi realizada uma coleta por estação do ano para a análise de possíveis variações sazonais por dois anos, tendo iniciado no verão entre 1999 e 2000 e terminado na primavera de 2001. Trata-se, portanto de oito coletas, realizadas com um intervalo de três meses, onde foram coletadas as amostras dos oito pontos selecionados já descritos.

II.3.1.2.2. Monitoramento da Qualidade das Águas Através da Coleta de Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico químicos alcalinidade, dureza, nitrito, nitrato, alumínio, coliformes totais, plâncton, temperatura do ar e da água, pH, oxigênio dissolvido, condutividade, DBO₅, DQO, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico, turbidez, fosfato orto e total, resíduo total, cádmio, chumbo, cobre, cromo total, mercúrio, níquel, zinco, cloreto, fenóis, surfactantes e coliformes fecais foram coletados e disponibilizados pelo DMAE. Estes dados são coletados mensalmente para avaliar a qualidade das águas.

Os parâmetros físico-químicos coletados foram correlacionados com os resultados biológicos obtidos no monitoramento das águas da bacia hidrográfica do Guaíba na região metropolitana de Porto Alegre.

II.3.1.2.3. Pluviosidade

Os dados pluviométricos foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia, 8º Distrito de Meteorologia em Porto Alegre. O índice pluviométrico total foi coletado uma semana antes da coleta de amostras até o último dia de amostragem do período (ver **Tabela 4**). O pluviômetro está localizado na referida estação meteorológica na Av. Cristiano Fischer, 1297 (LATITUDE 30.01 SUL; LONGITUDE 51.13 OESTE). Os períodos das coletas de amostras de águas e índice pluviométrico pode ser sumarizado na tabela que se segue:

Tabela 4. Estações do ano, datas e períodos de coleta das amostras e índice pluviométrico.

ESTAÇÃO	DIA DA COLETA	PONTOS	PERÍODO DE COLETA	
			AMOSTRAGEM	DO ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO
VERÃO 1999/2000	26/01 07/02 08/02 09/02 17/02	31, 57 e 58 38 e 40 51b 61 59	26/01 A 17/02/2000	19/01 A 17/02/2000
OUTONO 2000	17/05 18/05 23/05 25/05	31, 57 e 58 59 38, 40 e 51b 61	17/05 A 25/05/2000	10/05 A 25/05/2000
INVERNO 2000	10/08 28/08 29/08 30/08	31, 57, 58 e 59 38 e 40 51b 61	10/08 A 30/08/2000	03/08 A 30/08/2000
PRIMAVERA 2000	07/11 08/11 13/11 16/11 17/11	59 31, 57 e 58 38 e 40 51b 61	07/11 A 17/11/2000	01/11 A 17/11/2000
VERÃO 2000/2001	07/02 08/02 14/02 15/02 19/02	38 e 40 51b 59 31, 57 e 58 61	07/02 A 19/02/2001	31/01 A 19/02/2001
OUTONO 2001	07/05 08/05 10/05 15/05 16/05	38 e 40 51b 61 59 31, 57 e 58	07/05 A 16/05/2001	30/04 A 09/05/2001
INVERNO 2001	07/08 08/08 13/08 14/08 15/08	59 31, 57 e 58 38 e 40 51b 61	07/08 A 15/08/2001	31/07 A 15/08/2001
PRIMAVERA 2001	06/11 07/11 12/11 13/11 14/11	59 31, 57 e 58 38 e 40 51b 61	06/11 A 14/11/2001	30/10 A 14/11/2001

A pluviosidade foi juntada com os demais parâmetros físico-químicos coletados para a análise de componentes principais. Também foi correlacionada aos resultados obtidos no teste Cometa.

II.3.1.3. Teste Cometa em *G. schubarti* e *G. schubarti* Mixoplóide para Comparação da Sensibilidade em Relação à *G. tigrina*

Para comparação da sensibilidade genotóxica das planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* linhagem mixoplóide no teste Cometa, foram expostos indivíduos em amostras coletadas em duas estações do ano (verão de 1999/2000 e inverno de 2000) e os resultados foram avaliados através do teste Cometa.

II.3.1.4. Teste de Ames

O teste de Ames foi realizado pelo laboratório de prestação de serviços GENOTOX da Universidade Federal do Rio Grande do Sul nas amostras coletadas nos pontos 31, 58, 59, 38, 40, a cerca de 20 cm da superfície, no final de março e final de setembro de 2000 em conjunto com a equipe da COPESUL. Como esta tese é descritiva, decidimos trabalhar em conjunto com o laboratório GENOTOX para obtenção de dados mais completos em relação ao potencial genotóxico das águas da Bacia do Guaíba. Os dados do teste de Ames foram usados em testes estatísticos para comparação com os dados obtidos através do teste Cometa. As comparações estão descritas na discussão dos resultados.

II.3.2. Poluição do Ar

Para a padronização de testes a serem usados na avaliação múltipla da genotoxicidade da poluição urbana de Porto Alegre foi realizado o monitoramento *in loco* da poluição aérea através do uso do teste de mutação gênica nos pêlos estaminais das flores do clone 4430 de *Tradescantia* (*Trad*-SHM). A avaliação foi realizada duas vezes no ponto controle negativo, para obter-se um histórico da média de mutações espontâneas dessas plantas. Também foi realizada uma exposição aguda dos cortes de *Tradescantia* ao ar na Av. Silva Só esquina com Av. Ipiranga para detecção de possíveis diferenças em relação ao controle negativo histórico.

II.4. Descrição dos Testes

II.4.1. Planárias

II.4.1.1. Origem

G. tigrina e *G. schubarti* são coletadas à campo em várias localidades do estado do Rio Grande do Sul, mantendo-se nos cultivos de laboratório o cruzamento ao acaso para preservar a variabilidade genética característica das populações no seu ambiente natural. As planárias *G. schubarti* mixoplóides originaram-se de alguns indivíduos doados pelo Instituto de Pesquisa das Planárias da Universidade do Rio dos Sinos no ano de 1993. Estas reproduzem-se somente de forma assexuada.

II.4.1.2. Cultivo

As planárias são mantidas em laboratório dentro de recipientes plásticos atóxicos em água reconstituída (dureza 20 mgCaCO₃/L) em geladeiras com temperatura controlada (21°C). A alimentação é feita semanalmente com fígado de boi, ou gema de ovo. A água precisa ser mantida extremamente limpa, por isso é trocada juntamente com os recipientes, após a alimentação e novamente trocada 2 a 3 dias depois, quando já se completou o processo de digestão e foram liberados dejetos orgânicos (Wirth & Heller, 1985).

II.4.1.3. Exposição e Manutenção dos Testes

Para cada amostra testada mais controles negativo e positivo, foram expostas 7 planárias *G. tigrina* e *G. schubarti* jovens, de aproximadamente 3 meses de idade. As planárias de reprodução exclusivamente assexuada (*G. schubarti* mixoplóides) foram selecionadas pelo tamanho (entre 1,5 e 2 cm).

As planárias e as amostras de água são deixadas à temperatura ambiente para aclimação. Após a montagem do teste os recipientes plásticos atóxicos são mantidos em geladeira com temperatura controlada de 21°C. O tempo total de exposição é de 12 dias para o teste Cometa. As planárias são alimentadas dentro da amostra do ponto testado no primeiro dia e logo após substitui-se a água do ponto. No terceiro dia após o início da exposição as amostras são novamente trocadas. Alimenta-se novamente as planárias no quinto, sexto e sétimo dias após o início da exposição, sempre trocando a água da amostra antes e após a alimentação. No nono dia as planárias são cortadas e mantidas nas amostras para regeneração dos tecidos.

II.4.1.4. Exposição para o Controle Positivo

Para o controle positivo as planárias em regeneração são expostas ao clastogênico de referência MMS diluído em água de cultivo. Dilui-se 16,8 µL de MMS em 5 ml de meio Hanks. Enche-se uma proveta de 500 mL com aproximadamente 250 mL de água deionizada reconstituída, adiciona-se o meio Hanks (HBSS) contendo o clastogênico e agita-se vigorosamente com bastão de vidro. Completa-se o volume até 500 mL com a água de cultivo e agita-se novamente. A solução de MMS tem uma concentração final de 8×10^{-2} mM. As planárias são expostas ao MMS durante cinco horas.

II.4.2. Teste Cometa

II.4.2.1. Controle Interno do Teste

Como as condições do teste Cometa foram primeiramente estabelecidas para resultados em linfócitos humanos (Hartmann *et al.*, 1994; Hartmann & Speit, 1995; revisão em Fairbairn *et al.* 1995) estes são usados como controle interno dos testes realizados com outros organismos.

Para o controle positivo prepara-se uma solução-mãe de MMS, diluindo-se 3,4 µL de MMS em 1mL de HBSS pH=7,4, agita-se bem e reserva-se. Num *ependorf*, faz-se nova diluição: 10µL de solução-mãe em 990 µL de HBSS e agita-se. Essa solução é designada como controle I. Coloca-se 200 µL de sangue recém coletado heparinizado num *ependorf* e acrescenta-se 50 µL da solução I. Agita-se com cuidado, para não produzir danos mecânicos às células sanguíneas, e coloca-se em estufa à 37 °C durante 90 min. Para o controle negativo interno de sangue humano acrescenta-se 50 µL de HBSS em 200 µL de sangue e coloca-se em estufa juntamente com o controle positivo. Prepara-se as lâminas conforme descrito no item procedimento do teste.

II.4.2.2. Suspensão Celular

Após a exposição e três dias de regeneração dos animais é feita uma suspensão celular que será usada para o teste Cometa, totalizando doze dias até o procedimento do teste. Esta suspensão é realizada imediatamente antes da preparação das lâminas de cada amostra e/ou controles:

- a) Separa-se as caudas em regeneração das planárias expostas às amostras e/ou controles e coloca-se em *ependorfs* de 2 mL;

- b) Acrescenta-se 400 μL de tripsina 0,48% para desagregar o tecido e ajuda-se com pipeta Pasteur em movimentos suaves, por 2 min;
- c) Acrescenta-se 800 μL de soro bovino fetal e centrifuga-se durante 5 min à 1000 rpm;
- d) Descarta-se o líquido do *ependorf* com bomba de vácuo;
- e) Ressuspende-se o “pellet” de células em 100 a 200 μL de meio para planárias (MTTP), adaptando a concentração celular dessa solução para aproximadamente 10^6 células/ mm^3 .

Prepara-se as lâminas usando esta suspensão celular.

II.4.2.3. Procedimento do Teste Cometa

O teste Cometa é realizado a partir do protocolo de Singh *et al.* (1988) com alterações para adaptação do teste às células de planárias:

- a) pré-cobertura das lâminas com agarose normal à 1,5% diluída em PBS;
- b) recobrimento das lâminas com agarose normal 0,75%;
- c) mistura das células em suspensão (10 μL) com agarose “low melting” 0,75% (90 μL), distribuição nas lâminas e recobrimento com lamínula para gelificação em geladeira durante 5 min;
- d) as lamínulas são retiradas e as lâminas são colocadas em solução de lise (pH=10) por no mínimo 1 hora, protegidas da luz em geladeira;
- e) após a lise as lâminas são colocadas na cuba de eletroforese horizontal, sendo cobertas por solução tampão alcalina (pH=12,6) permanecendo ali por 20 min;
- f) eletroforese por 20 min a 25 volts e corrente de 300 mA;
- g) lavagem das lâminas com solução neutralizadora (Tris pH=7,5);
- h) coloração com brometo de etídio.

Para a análise são necessárias de 25 células por lâmina e 2 lâminas por grupo tratado. São preparadas sempre 3 lâminas por tratamento para ter-se uma margem de segurança. Ao microscópio as imagens de forma circular demonstram que o DNA não foi lesado, e em forma de “cometa” demonstram lesão. A análise foi feita com medidas das células através de uma lente ocular com escala (Betti *et al.*, 1994); e através da avaliação visual das classes de dano (de 0 - sem dano, à IV - dano máximo), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (Collins *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994). O índice de dano (ID) é calculado através da frequência relativa de células com as classes de dano visualizadas, multiplicada pelo valor atribuído a cada classe,

de 0 a 4. Soma-se tudo e têm-se o ID da amostra e/ou controles. Os testes estatísticos usados estão listados na descrição geral dos experimentos para monitoramento da água.

II.4.3. *Salmonella typhimurium*

As linhagens utilizadas foram TA100 e TA98.

II.4.4. Teste de Ames ou teste de reversão gênica em *Salmonella typhimurium*

Os testes foram realizados pelo laboratório de prestação de serviços GENOTOX do centro de Biotecnologia da UFRGS.

A metodologia do teste de Ames, aplicado por Vilella (2001) está descrita na tese Avaliação Genotóxica pelo Teste *Salmonella*/microsoma e Determinação de Contaminantes Químicos de Amostras de Água Superficial da Bacia do Guaíba.

II.4.5. *Tradescantia*

II.4.5.1. Origem

As mudas de *Tradescantia* clone 4430 foram cedidas pelo Dr. Geraldo Stachetti Rodrigues da Embrapa Meio Ambiente.

II.4.5.2. Cultivo

As mudas estão em casa de vegetação recebendo luz suplementar que perfaz um total de 17 horas/luz ao dia (Rodrigues *et al.*, 1998). Os vasos são regados aproximadamente a cada 3 dias com água de torneira. A cada 15 dias são cortadas as hastes contendo inflorescências para induzir novas florações.

II.4.5.3. Exposição

Para os testes são expostos 15-20 cortes contendo inflorescências jovens, por tratamento, colhidos 24 h antes da exposição. Os cortes são mantidos em água deionizada, com aeração constante, para um período de adaptação prévia à exposição (Rodrigues *et al.*, 1998).

Foram avaliados os cortes coletados na casa de vegetação para estabelecer-se a taxa de mutações induzidas espontaneamente. Inicialmente conta-se o número de pêlos estaminais das flores para determinar-se o número médio de pêlos estaminais por flor e o número de eventos mutacionais. O número médio de pêlos estaminais passa a ser usado como padrão para os testes e a taxa de mutação espontânea é o controle negativo para comparação com os resultados das exposições nos pontos a serem avaliados. Os cortes foram expostos no ponto de monitoramento do ar selecionado para o teste prévio (Av. Silva Só, esquina com Av. Ipiranga) por 14 horas.

II.4.6. Teste *Trad*-SHM

Após a exposição os cortes são mantidos em água deionizada com aeração durante aproximadamente 10 dias. Este é o tempo de recuperação. No intervalo entre o sétimo e o nono dia de recuperação as flores se abrem e faz-se a montagem e leitura das lâminas. Conforme Ma, Saldiva & Rodrigues (Com. Pessoal 1998), as seis anteras de cada flor devem ser removidas com pinça muito fina. Utilizando a pinça pega-se muito bem na base dos estames e puxa-se tudo junto, livrando o conjunto da corola. Os estames são separados sobre a lâmina e os pêlos são "penteados" em água e glicerina (1=1) para manter o

equilíbrio osmótico. São preparadas 10 lâminas por grupo de tratamento. Para a contagem de mutações em pêlos estaminais de *Tradescantia* são analisados:

- a) 6 estames por flor; 7 flores ($n = 7$);
- b) conta-se o número de eventos mutacionais por flor;
- c) calcula-se o número total de eventos mutacionais/número total de pêlos;
- d) apresenta-se os resultados como número de mutações/1000 pêlos.

II.5. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos nos experimentos foi utilizado o programa SPSS for Windows versão 9.0.0 de dezembro de 1998. Os testes foram aplicados em adequação às hipóteses testadas sobre os resultados obtidos nos experimentos. Foram aplicados basicamente três tipos de testes: Correlação de Pearson, ANOVA e teste t entre amostras pareadas. Quando exigido pelas condições da amostra foram realizados testes não-paramétricos.

Para a correlação entre os resultados biológicos e os parâmetros físico-químicos coletados pelo DMAE usou-se análise fatorial através da ferramenta estatística de análise de componentes principais (Teixeira *et al.*, 2000). Este instrumento agrupa os diferentes parâmetros físico-químicos coletados em novas variáveis ou fatores, que são combinações lineares das originais, com preservação de 83,3% dos dados originais. Os componentes principais foram obtidos através de uma matriz de correlação. A rotação Varimax foi aplicada para aperfeiçoar a interpretação dos fatores tomados na extração parcial e total. Estes fatores reduzidos podem então ser usados para plotar gráficos, onde pode-se ter uma estimativa visual de como eles determinam e evidenciam a distribuição dos resultados dos parâmetros testados (ver Resultados e Discussão).

III. RESULTADOS

III.1. Curva de Sensibilidade de *G. schubarti* Mixoplóide Determinada a Partir do Teste Cometa

As planárias *G. schubarti* linhagem mixoplóide, que possuem células diplóides ($2n=8$) e triplóides ($3n=12$), foram testadas quanto à adequação ao teste Cometa. Se uma espécie responde de maneira dependente de dose quando submetida a concentrações crescentes de um mutagênico conhecido, está assegurado o seu uso para avaliação de amostras ambientais complexas. *G. schubarti* mixoplóides têm mostrado respostas interessantes quando tratadas com radiação γ avaliadas pelo teste de aberrações cromossômicas (Jaeger, 2001; dados não publicados). Para ampliar essa investigação elas foram usadas para conferir a correlação dose-resposta a um produto químico de referência, sabidamente genotóxico. O Metil Metanossulfonato é um clastogênico de ação direta, muito potente na indução de danos no DNA. As planárias foram expostas a doses crescentes de Metil Metanossulfonato (ver **Tabela 2**, Material e Métodos) e controle negativo de água reconstituída. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**. No **Gráfico 1** está representada a curva dose-resposta, para melhor visualizar os dados obtidos neste experimento.

Tabela 5. Resultados da curva de sensibilidade de *G. schubarti* mixoplóides expostas ao mutagênico de ação direta MMS, determinada a partir do teste Cometa.

MMS ($\times 10^{-2}$ mM)	ÍNDICE DE DANO
0	12,3
4	45,0
6	56,0
8	62,0
12	88,0
16	106,0
24	175,0
32	184,0

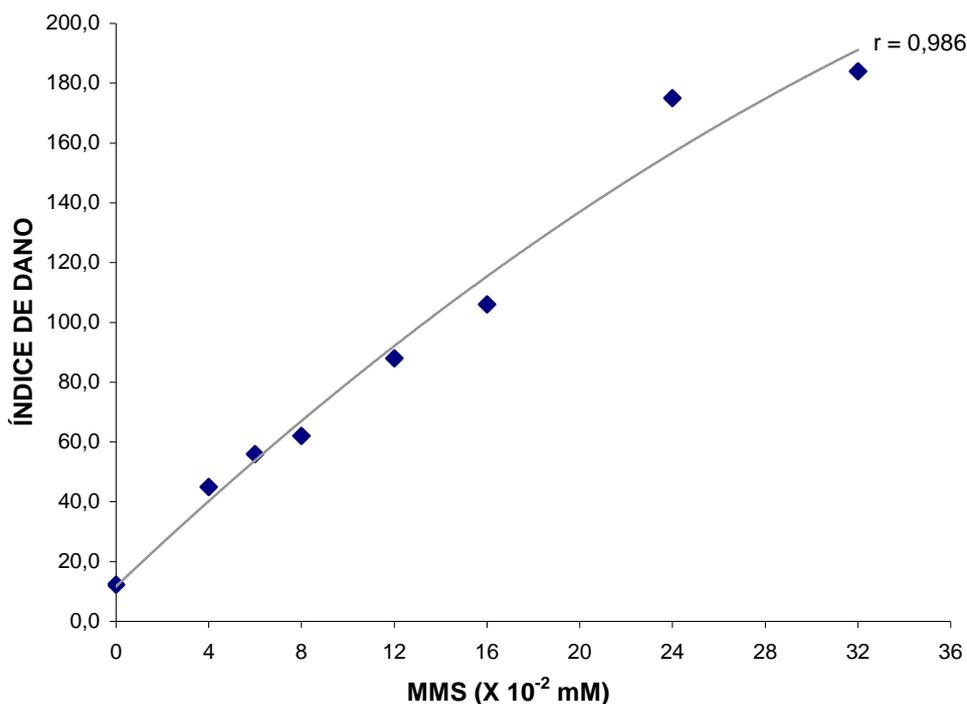


Gráfico 1. Curva dos índices de dano obtidos em *G. schubarti* mixoplóide expostas a doses crescentes do clastogênico de ação direta MMS avaliadas pelo teste Cometa.

As planárias da espécie *G. schubarti* linhagem mixoplóide responderam de maneira dependente de dose à exposição ao MMS nas concentrações usadas, como pode-se verificar nas Tabelas 5 e Gráfico 1. O teste de Pearson aplicado mostra a alta correlação dose-resposta ($r=0,986$), estatisticamente significante ($p=0,000$). O teste t entre amostras pareadas mostra a diferença entre as doses de MMS e os índices de dano induzidos pelas mesmas ($p=0,003$).

Esse resultado mostra a adequação das planárias *G. schubarti* mixoplóides para uso como organismos-teste para ensaios de genotoxicidade através do teste Cometa. A partir desse experimento selecionamos a dose de 16×10^{-2} mM MMS para o próximo experimento, que avaliou o tempo de permanência da resposta positiva à exposição ao clastogênico de ação direta MMS. Os resultados são apresentados na **Tabela 6** e no **Gráfico 2**.

III.2. Permanência da Resposta Positiva Induzida pelo MMS em *G. schubarti* Mixoplóide

Tabela 6. Permanência do dano no DNA em *G. schubarti* mixoplóide após exposição ao clastogênico MMS (16×10^{-2} mM) durante 5 horas ao longo do tempo (h) avaliada pelo teste Cometa.

TEMPO DE REPARAÇÃO (h)	ÍNDICE DE DANO
0	200,0
2	159,0
4	178,0
8	155,0
12	156,0
18	158,0
24	132,0
48	111,0
C-	X de 3 lâminas 20,6

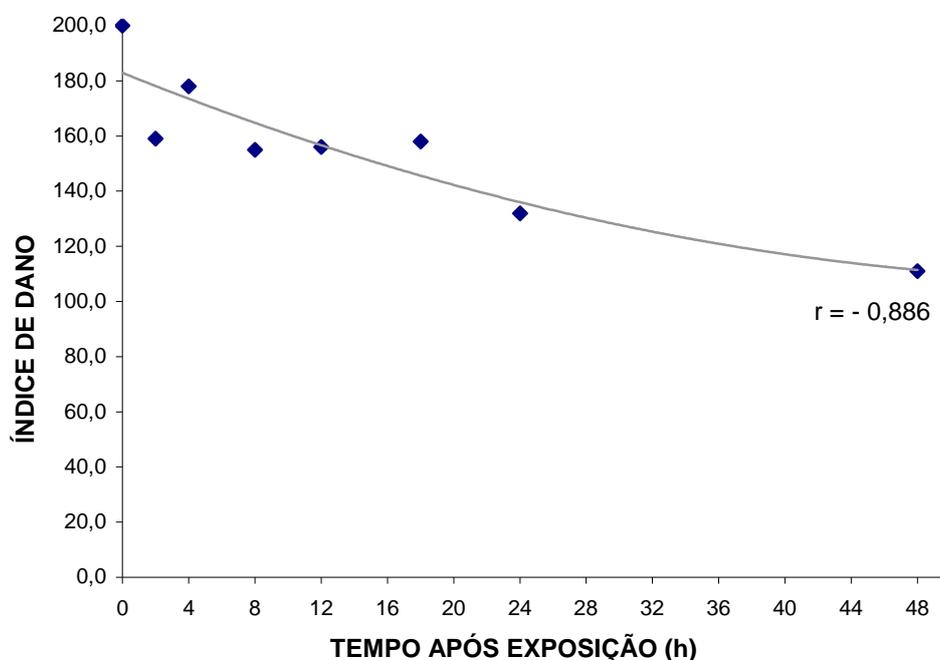


Gráfico 2. Permanência da resposta positiva ao longo do tempo induzida por MMS 16×10^{-2} mM em *G. schubarti* linhagem mixoplóide.

Há correlação negativa ($r=-0,886$) e significativa ($p=0,003$) entre o tempo de reparação e o índice de dano avaliados no teste Cometa em *G. schubarti* mixoplóide. À medida que o tempo progride após a indução da mutagenicidade, o índice de dano diminui, pois há reparação. Há diferença significativa no índice de dano ao longo do tempo avaliada pelo Teste t de amostras pareadas ($p=0,000$). Este experimento mostrou que o dano induzido no DNA pelo tratamento é reparado lentamente pelas planárias. Dois dias após a indução, o dano persiste numa taxa de cerca de 50% em relação ao momento zero, logo após a suspensão do agente mutagênico, indicando que a reparação é lenta.

Através destes resultados verificou-se que *G. schubarti* mixoplóide também pode ser usada como organismo-teste, assim como as demais planárias utilizadas neste trabalho, cuja adequação para testes de genotoxicidade já havia sido avaliada em outros experimentos (Lau, 1998).

III.3. Resultados do Monitoramento *in Loco* em Porto Alegre

III.3.1. Monitoramento das Águas da Bacia do Guaíba pelo Teste Cometa em *G. tigrina*

Dentre as planárias passíveis de uso no teste Cometa – *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide, foi escolhida *G. tigrina* para o monitoramento das águas da bacia hidrográfica do Guaíba na região metropolitana de Porto Alegre. *G. tigrina* tem reprodução sexuada e produz mais descendentes em condições de laboratório (Knakievicz, 1998) do que *G. schubarti*, o que justifica o seu uso, já que são necessários muitos indivíduos a cada teste (ver Material e Métodos). As planárias expostas têm todas aproximadamente 3 meses de idade, tendo sido admitida uma diferença de uma semana, a mais ou a menos. Com três meses as planárias atingem a maturidade sexual. *G. schubarti* mixoplóide, apesar de reproduzir-se mais rapidamente, não foi usada porque tem reprodução exclusivamente assexuada e, portanto, variabilidade genética reduzida, o que foge das condições geralmente encontradas na natureza.

Como já descrito anteriormente (ver Material e Métodos), foram avaliadas amostras de água de oito pontos diferentes da bacia hidrográfica do Guaíba, na região metropolitana de Porto Alegre, durante dois anos. Estes pontos são algumas das estações de coleta usadas pelo DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgotos, para avaliar a qualidade das águas do Guaíba, pois este manancial abastece a região metropolitana de Porto Alegre. Os pontos de coleta foram selecionados por terem sido considerados como representativos na formação e composição das águas do Lago Guaíba.

Os pontos de coleta localizam-se na foz dos rios formadores do Lago Guaíba:

- Gravataí;
- Jacuí;
- Caí;
- Sinos;

e ao longo do corpo principal do manancial:

- Arroio Dilúvio/Ipiranga – área de grande impacto ambiental segundo pesquisadores que participaram com dados para o Atlas Ambiental de Porto Alegre (1998);

- Ponta da Cadeia – onde há lançamento do esgoto de Porto Alegre;
- Guaíba R – ponto junto ao lançamento de efluentes industriais e
- Guaíba LP – perto da saída das águas do Guaíba para a Lagoa dos Patos.

Na **Tabela 7** estão apresentados, em resumo, todos os dados obtidos durante estes dois anos de monitoramento de águas, usando a planária *G. tigrina* como organismo bioindicador e o teste Cometa para avaliar o dano genotóxico.

Tabela 7. Teste Cometa em *G. tigrina* para Avaliação do Potencial Genotóxico da Poluição da Águas da Bacia do Guaíba.

LOCAL	PONTO	ESTACÃO	ID	DP	C-	DP	C+
Gravataí	31	Verão99/00	50	11,60	19	5,83	76
Gravataí	31	Outono00	56	11,60	19	5,83	103
Gravataí	31	Inverno00	47	11,60	22	5,83	112
Gravataí	31	Primavera00	47	11,60	15	5,83	91
Gravataí	31	Verão00/01	52	11,60	13	5,83	78
Gravataí	31	Outono01	59	11,60	29	5,83	127
Gravataí	31	Inverno01	78	11,60	28	5,83	171
Gravataí	31	Primavera01	72	11,60	26	5,83	149
Jacuí	57	Verão99/00	31	10,08	19	5,83	76
Jacuí	57	Outono00	36	10,08	19	5,83	103
Jacuí	57	Inverno00	31	10,08	22	5,83	112
Jacuí	57	Primavera00	53	10,08	15	5,83	91
Jacuí	57	Verão00/01	47	10,08	13	5,83	78
Jacuí	57	Outono01	36	10,08	29	5,83	127
Jacuí	57	Inverno01	57	10,08	28	5,83	171
Jacuí	57	Primavera01	36	10,08	26	5,83	149
Caí	58	Verão99/00	35	13,94	19	5,83	76
Caí	58	Outono00	56	13,94	19	5,83	103
Caí	58	Inverno00	75	13,94	22	5,83	112
Caí	58	Primavera00	46	13,94	15	5,83	91
Caí	58	Verão00/01	67	13,94	13	5,83	78
Caí	58	Outono01	50	13,94	29	5,83	127
Caí	58	Inverno01	67	13,94	28	5,83	171
Caí	58	Primavera01	71	13,94	26	5,83	149
Sinos	59	Verão99/00	61	18,36	19	5,83	76
Sinos	59	Outono00	40	18,36	19	5,83	103
Sinos	59	Inverno00	50	18,36	22	5,83	112
Sinos	59	Primavera00	43	18,36	15	5,83	91
Sinos	59	Verão00/01	24	18,36	13	5,83	78
Sinos	59	Outono01	40	18,36	29	5,83	127
Sinos	59	Inverno01	44	18,36	28	5,83	171
Sinos	59	Primavera01	86	18,36	26	5,83	149
Ponta da Cadeia	38	Verão99/00	18	22,10	19	5,83	76
Ponta da Cadeia	38	Outono00	25	22,10	19	5,83	103
Ponta da Cadeia	38	Inverno00	90	22,10	22	5,83	112
Ponta da Cadeia	38	Primavera00	34	22,10	15	5,83	91
Ponta da Cadeia	38	Verão00/01	48	22,10	13	5,83	78
Ponta da Cadeia	38	Outono01	54	22,10	29	5,83	127
Ponta da Cadeia	38	Inverno01	37	22,10	28	5,83	171
Ponta da Cadeia	38	Primavera01	45	22,10	26	5,83	149
Dilúvio	40	Verão99/00	20	25,12	19	5,83	76
Dilúvio	40	Outono00	61	25,12	19	5,83	103
Dilúvio	40	Inverno00	71	25,12	22	5,83	112
Dilúvio	40	Primavera00	27	25,12	15	5,83	91
Dilúvio	40	Verão00/01	33	25,12	13	5,83	78
Dilúvio	40	Outono01	49	25,12	29	5,83	127
Dilúvio	40	Inverno01	94	25,12	28	5,83	171
Dilúvio	40	Primavera01	66	25,12	26	5,83	149
Guaíba R	51b	Verão99/00	67	21,69	19	5,83	76
Guaíba R	51b	Outono00	36	21,69	19	5,83	103
Guaíba R	51b	Inverno00	38	21,69	22	5,83	112
Guaíba R	51b	Primavera00	60	21,69	15	5,83	91
Guaíba R	51b	Verão00/01	42	21,69	13	5,83	78
Guaíba R	51b	Outono01	31	21,69	29	5,83	127
Guaíba R	51b	Inverno01	92	21,69	28	5,83	171
Guaíba R	51b	Primavera01	74	21,69	26	5,83	149
Guaíba LP	61	Verão99/00	52	13,19	19	5,83	76
Guaíba LP	61	Outono00	23	13,19	19	5,83	103
Guaíba LP	61	Inverno00	63	13,19	22	5,83	112
Guaíba LP	61	Primavera00	53	13,19	15	5,83	91
Guaíba LP	61	Verão00/01	51	13,19	13	5,83	78
Guaíba LP	61	Outono01	38	13,19	29	5,83	127
Guaíba LP	61	Inverno01	49	13,19	28	5,83	171
Guaíba LP	61	Primavera01	63	13,19	26	5,83	149

índice de dano (ID); controle negativo (C-); controle positivo (C+) e desvio padrão (DP).

III.3.1.1. Correlação do Índice de Dano (ID) entre Grupo-Teste e Controle Negativo (C-)

As amostras coletadas em uma determinada estação foram avaliadas conjuntamente, formando um grupo-teste. Por isso os controles negativos e positivos são iguais para esta determinada estação. Dessa forma, se tomarmos como exemplo o Inverno de 2000, o índice de dano medido para o controle negativo se repetirá em qualquer ponto; terá sempre o valor de 22, e o índice do controle positivo terá sempre o valor de 112. Sendo os controles iguais para todas as amostras testadas em uma estação teremos sempre o mesmo desvio padrão para este grupo-teste, e pode-se verificar se há influências metodológicas, inerentes à técnica do Cometa, sobre o resultado. Para isso foi feito um teste de correlação entre os controles negativos e os resultados das águas testadas.

A correlação de Pearson ($r=0,298$) entre o índice de dano e o controle negativo foi significativa em nível de 5%. O teste Cometa caracteriza-se pela heterogeneidade das respostas, dependentes de variações mínimas nas condições do teste (ver Discussão). Para eliminar tais variações, inerentes à técnica, decidimos adotar uma nova variável a partir da diferença entre o índice de dano obtido nas amostras e o controle negativo migrado em cada teste. Esta variável é identificada por ID – C- ou DELTANEG (designação da variável nos gráficos e nas tabelas do programa estatístico SPSS). Tal grandeza é mais autêntica e isenta de vieses técnicos que podem surgir caso haja correlação entre o ID e o C- obtido nos testes. Quando não há correlação o ID é aceitável, mas ID – C- continua sendo a variável mais confiável.

III.3.1.2. Índice de Dano (ID) das Águas Testadas

A diferença entre o índice de dano (ID) e o controle negativo (C-) testada através do teste t foi significativa para os dados obtidos no monitoramento do manancial ($p=0,000$). Isso significa que houve danos significativos no DNA das planárias *G. tigrina* expostas às amostras em geral, coletadas na bacia do Guaíba na cidade de Porto Alegre – RS. A resposta positiva no teste Cometa indica que foi detectado potencial genotóxico das águas coletadas nos pontos 31, 57, 58, 59, 38, 40, 51b e 61 da bacia do Guaíba nos anos de 2000 e 2001.

III.3.1.3. Diferença entre Pontos de Coleta

A diferença entre pontos de coleta foi inicialmente analisada por ANOVA. Resultados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Teste de homogeneidade de variâncias e ANOVA para verificar se há diferenças entre os pontos de coleta testados com *G. tigrina*.

Teste de Homogeneidade de Variâncias					
DELTANEG					
Estadística de Levene	df1	df2	Sig.		
1,49	7	56	,191		

ANOVA					
DELTANEG					
	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	2232,25	7	318,89	1,124	,361
Dentro dos Grupos	15889,60	56	283,74		
Total	18121,85	63			

Os resultados mostraram que as variâncias são homogêneas ($p=0,191$) e que não há diferenças significativas entre o índice de dano menos controle negativo entre os pontos amostrados entre o verão de 1999/2000 e a primavera de 2001 ($p=0,361$) analisados pelo teste Cometa em *G. tigrina*. Os pontos apresentam um potencial mutagênico positivo, como já testado ($p=0,000$), mas não há diferenças significativas entre eles por ANOVA. Considerando que nesse caso ANOVA não é um teste muito sensível em função das variâncias elevadas (ver **Tabela descritiva 10** abaixo), fez-se a comparação entre amostras pareadas.

Para verificar se algum ponto apresenta maior genotoxicidade que outro, foram comparadas as médias dos resultados ID – C- das oito coletas de cada ponto. Foi aplicado o teste estatístico t entre amostras pareadas. O resultado dos testes estatísticos é apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Comparação entre ID – C- dos pontos de coleta localizados no Guaíba obtidos no teste Cometa em *G. tigrina*.

	Diferenças Pareadas							Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão Médio	Intervalo de Confiança de 95% para as Diferenças		t	df	
				Inferior	Superior			
Gravataí - Jacuí	16,69	12,50	4,42	6,24	27,14	3,776	7	★ ,007
Gravataí - Caí	-,81	14,26	5,04	-12,74	11,11	-,161	7	,877
Gravataí - Sinos	9,06	17,82	6,30	-5,84	23,96	1,438	7	,194
Gravataí - Ponta da Cadeia	13,69	26,59	9,40	-8,55	35,92	1,456	7	,189
Gravataí - Arroio Dilúvio	4,94	18,71	6,61	-10,70	20,58	,747	7	,480
Gravataí - Guaíba R	2,56	16,66	5,89	-11,36	16,49	,435	7	,677
Gravataí - Guaíba R	8,56	17,49	6,18	-6,06	23,19	1,385	7	,209
Jacuí - Caí	-17,50	16,35	5,78	-31,17	-3,83	-3,027	7	★ ,019
Jacuí - Sinos	-7,63	24,28	8,58	-27,92	12,67	-,888	7	,404
Jacuí - Ponta da Cadeia	-3,00	26,37	9,32	-25,04	19,04	-,322	7	,757
Jacuí - Arroio Dilúvio	-11,75	25,50	9,02	-33,07	9,57	-1,303	7	,234
Jacuí - Guaíba R	-14,12	18,96	6,70	-29,98	1,73	-2,107	7	☆ ,073
Jacuí - Guaíba LP	-8,13	16,56	5,85	-21,97	5,72	-1,388	7	,208
Caí - Sinos	9,87	22,33	7,89	-8,79	28,54	1,251	7	,251
Caí - Ponta da Cadeia	14,50	16,43	5,81	,76	28,24	2,496	7	★ ,041
Caí - Arroio Dilúvio	5,75	18,02	6,37	-9,32	20,82	,902	7	,397
Caí - Guaíba R	3,38	25,40	8,98	-17,86	24,61	,376	7	,718
Caí - Guaíba LP	9,37	15,38	5,44	-3,48	22,23	1,724	7	,128
Sinos - Ponta da Cadeia	4,63	29,49	10,42	-20,03	29,28	,444	7	,671
Sinos - Arroio Dilúvio	-4,13	28,65	10,13	-28,08	19,83	-,407	7	,696
Sinos - Guaíba R	-6,50	20,70	7,32	-23,81	10,81	-,888	7	,404
Sinos - Guaíba LP	-,50	16,58	5,86	-14,36	13,36	-,085	7	,934
Ponta da Cadeia - Arroio Dilúvio	-8,75	26,83	9,48	-31,18	13,6772	-,923	7	,387
Ponta da Cadeia - Guaíba R	-11,12	36,53	12,92	-41,67	19,4178	-,861	7	,418
Ponta da Cadeia - Guaíba LP	-5,13	19,90	7,04	-21,76	11,5142	-,728	7	,490
Arroio Dilúvio -Guaíba R	-2,37	27,88	9,86	-25,68	20,9307	-,241	7	,816
Arroio Dilúvio - Guaíba LP	3,63	28,24	9,98	-19,98	27,2329	,363	7	,727
Guaíba R - Guaíba LP	6,00	20,28	7,17	-10,96	22,9576	,837	7	,430

★ Significância para 0,01. ★ Significância para 0,05. ☆ Significância para 0,10.

Há diferenças significativas entre o Gravataí e o Jacuí ($p=0,007$), entre o Caí e o Jacuí ($p=0,019$) e entre o Caí e a Ponta da Cadeia ($p=0,041$). Foi verificada uma tendência à significância na diferença entre Guaíba R, que recebe descarga de efluente da Riocell e Jacuí ($p=0,073$). O ponto localizado no rio Jacuí é o menos poluído dentre os locais de coleta.

Na **Tabela 10** está apresentado o resumo dos dados obtidos por ponto. Constam a média e desvio padrão do controle negativo (C-), índices de dano (ID) e dano menos controle negativo (ID – C-) por local ou ponto de coleta, ordenados do ponto de maior potencial genotóxico (Rio Cai) para o ponto de menor capacidade de induzir danos às planárias *G. tigrina* (Rio Jacuí). Para melhor visualização ver **Gráfico 3**.

Tabela 10. Resumo do monitoramento do Guaíba com *G. tigrina*. Média e desvio padrão do controle negativo, índices de dano e dano menos controle negativo dos locais ou pontos de coleta.

	LOCAL	PONTO	ID	C-	ID – C-
			X ± DP	X ± DP	X ± DP
↑ dano	Caí	58	58,38 ± 13,94	21,26 ± 5,83	37,11 ± 13,85
	Gravataí	31	57,63 ± 11,60	21,26 ± 5,83	36,30 ± 8,41
	Guaíba R	51b	55,00 ± 21,69	21,26 ± 5,83	33,74 ± 20,80
	Dilúvio	40	52,63 ± 25,12	21,26 ± 5,83	31,36 ± 21,57
	Guaíba LP	61	49,00 ± 13,19	21,26 ± 5,83	27,74 ± 14,40
	Sinos	59	48,50 ± 18,36	21,26 ± 5,83	27,24 ± 16,77
	Ponta da Cadeia	38	43,88 ± 22,10	21,26 ± 5,83	22,61 ± 21,72
	Jacuí	57	40,88 ± 10,08	21,26 ± 5,83	19,61 ± 12,20

No **Gráfico 3** abaixo, estão representados os resultados do monitoramento do potencial genotóxico das águas da bacia do Guaíba através do teste Cometa em *G. tigrina*. Os resultados foram plotados a partir da variável de interesse ID – C-.

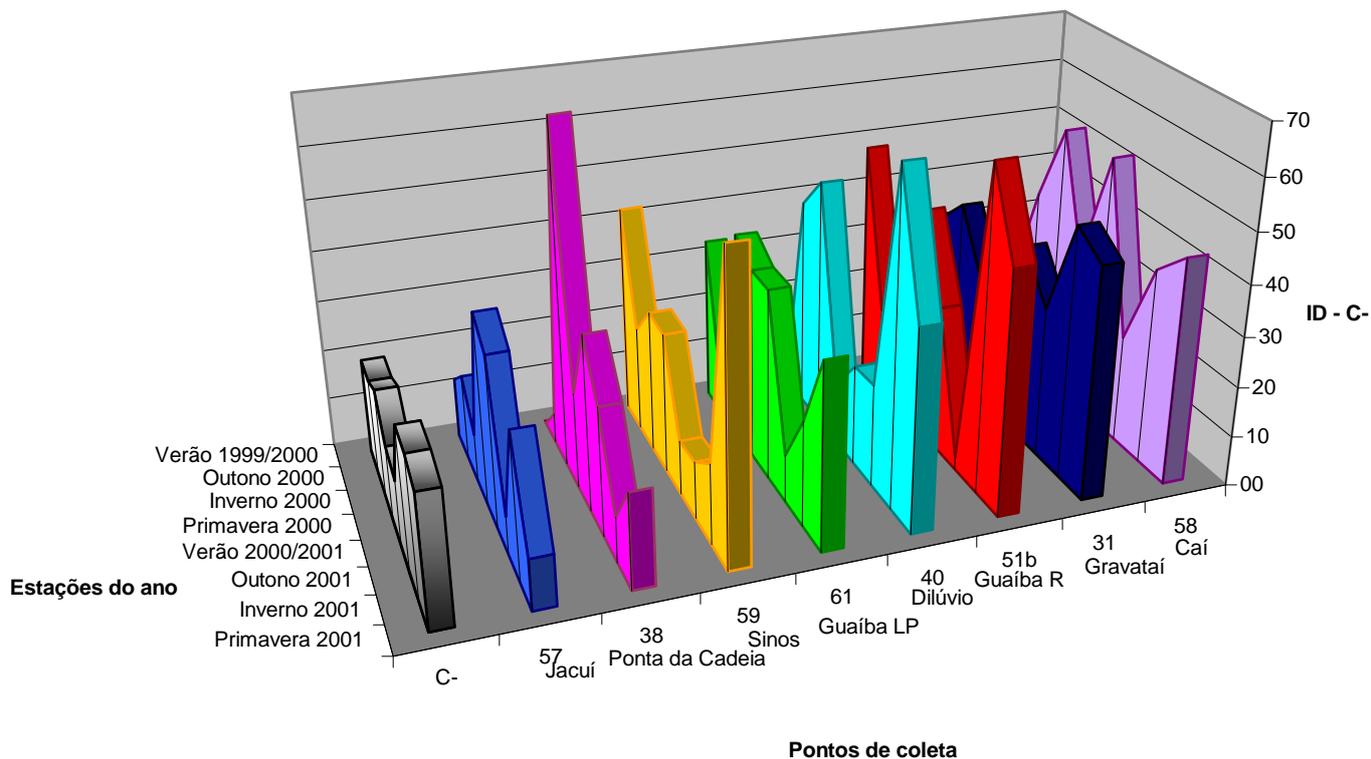


Gráfico 3. Plotagem dos resultados (ID – C-) obtidos no monitoramento de *G. tigrina* .

Vê-se o controle negativo representado na primeira área tridimensional, com índice de dano significativamente inferior ao dos pontos ($p=0,000$) e vê-se a variação do ID – C- dos pontos ao longo das estações do ano em que foram realizadas as coletas. Os pontos estão ordenados conforme o ID – C-. O Rio Jacuí, com menor potencial genotóxico, bem à frente e o Caí, com o maior potencial genotóxico, ao fundo.

III.3.1.4. Comparação entre as Estações do Ano

É importante verificar se há variações sazonais significativas no potencial genotóxico das amostras de águas da bacia do Guaíba. A região metropolitana de Porto Alegre se caracteriza por um clima Sub-Tropical úmido, com quatro estações bem definidas. As características climáticas das quatro estações, no que se refere às temperaturas, podem ser descritas da seguinte forma: na Primavera, que inicia no dia 23 de setembro e vai até o dia 21 de dezembro, as temperaturas variam de 15° a 30°. O verão começa no dia 21 de dezembro e termina no dia 21 de março, com temperaturas entre 25° e 38°. O outono vai de 21 de março a 21 de junho com temperaturas entre 10° a 25°. Por fim o inverno inicia no

dia 21 de junho e se estende até 23 de setembro, com temperaturas oscilando entre 2° a 15° em média.

Na **Tabela 11** está a estatística descritiva da variável de interesse ID – C- para todas as estações do ano e a análise de variâncias (ANOVA) usada na comparação.

Tabela 11. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para a comparação entre as estações dos anos de 2000 e 2001 amostradas e avaliadas pelo teste Cometa em *G. tigrina*.

Descrições								
DELTANEG								
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança de 95% para a Média		Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite Superior		
Verão 1999/2000	8	22,75	18,44	6,52	7,34	38,16	-1,00	48,00
Outono 2000	8	22,63	14,53	5,14	10,48	34,77	4,00	42,00
Inverno 2000	8	36,53	20,07	7,10	19,74	53,31	9,40	68,40
Primavera 2000	8	30,38	10,73	3,79	21,40	39,35	12,00	45,00
Verão 2000/2001	8	32,50	12,95	4,58	21,67	43,33	11,00	54,00
Outono 2001	8	16,06	9,66	3,42	7,98	24,14	2,50	30,00
Inverno 2001	8	36,75	21,67	7,66	18,63	54,87	9,00	66,00
Primavera 2001	8	38,13	16,24	5,74	24,55	51,70	10,00	60,00
Total	64	29,46	16,96	2,12	25,23	33,70	-1,00	68,40

Teste de Homogeneidade de Variâncias

DELTANEG			
Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
1,897	7	56	,087

ANOVA

DELTANEG					
	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	3675,63	7	525,09	2,035	,066
Dentro dos Grupos	14446,22	56	257,97		
Total	18121,85	63			

As variâncias são homogêneas ($p=0,087$) e não há diferença entre as estações quando foram coletadas as amostras quanto à variável ID – C- ($p=0,066$). No entanto, as amostras de inverno apresentam maior dano médio do que as amostras de verão.

Como a análise da diferença entre estações do ano não foi significativa quanto à variável ID – C-, resolvemos testar se há diferenças entre as estações quanto à variável índice de dano (ID). O teste estatístico está apresentado na **Tabela 12** abaixo.

Tabela 12. Comparação entre as estações do ano quanto à variável índice de dano.

Descrições								
DANO								
					Intervalo de Confiança de 95% para a Média			
	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Limite Inferior	Limite Superior	Mínimo	Máximo
Verão 1999/2000	8	41,75	18,44	6,52	26,34	57,16	18,00	67,00
Outono 2000	8	41,63	14,53	5,14	29,48	53,77	23,00	61,00
Inverno 2000	8	58,13	20,07	7,10	41,34	74,91	31,00	90,00
Primavera 2000	8	45,38	10,73	3,79	36,40	54,35	27,00	60,00
Verão 2000/2001	8	45,50	12,95	4,58	34,67	56,33	24,00	67,00
Outono 2001	8	44,63	9,77	3,45	36,46	52,79	31,00	59,00
Inverno 2001	8	64,75	21,67	7,66	46,63	82,87	37,00	94,00
Primavera 2001	8	64,13	16,24	5,74	50,55	77,70	36,00	86,00
Total	64	50,73	17,80	2,22	46,29	55,18	18,00	94,00

Teste de Homogeneidade de Variâncias

DANO			
Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
1,884	7	56	,089

ANOVA

DANO					
	Soma dos Qadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	5500,11	7	785,73	3,043	,009
Dentro dos Grupos	14460,38	56	258,22		
Total	19960,48	63			

Quando é usada a variável índice de dano para avaliar a diferença entre as estações do ano, o resultado é significativo ($p=0,009$) segundo ANOVA. Este dado relaciona-se à diferença discutível por estar muito próxima ao limite da significância ($p=0,05015175044537$), obtida entre o verão ($X=48,96$) e o inverno ($X=58,21$) nos dados referentes a todas as espécies, *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide, tomadas em conjunto (**Tabela 22**) (ver Discussão).

Para verificar quais estações diferem foram realizados dois testes *post hoc*, o teste de Duncan e o teste de Ryan-Einot- Gabriel-Welsch F que agrupam subgrupos homogêneos quanto à variável em questão.

DANO					
	Estação do ano	N	Subgrupos para alpha = ,05		
			1	2	3
Duncan ^a	Outono 2000	8	41,63		
	Verão 1999/2000	8	41,75		
	Outono 2001	8	44,63		
	Primavera 2000	8	45,38		
	Verão 2000/2001	8	45,50		
	Inverno 2000	8	58,13	58,13	
	Primavera 2001	8		64,13	
	Inverno 2001	8		64,75	
	Sig.		,076	,443	
Ryan-Einot-Gabriel-Welsch F	Outono 2000	8	41,63		
	Verão 1999/2000	8	41,75	41,75	
	Outono 2001	8	44,63	44,63	
	Primavera 2000	8	45,38	45,38	
	Verão 2000/2001	8	45,50	45,50	45,50
	Inverno 2000	8	58,13	58,13	58,13
	Primavera 2001	8		64,13	64,13
	Inverno 2001	8			64,75
	Sig.		,428	,054	,137

Foram mostradas as médias dos grupos dos subgrupos homogêneos.

a. Usa média harmônica do tamanho das amostras = 8.

No teste de Duncan há a separação de dois subgrupos, sendo que o primeiro difere do segundo. Os dois subgrupos são:

Outono 2000	Inverno 2000
Verão 1999/2000	Primavera 2001
Outono 2001	Inverno 2001
Primavera 2000	
Verão 2000/2001	
Inverno 2000	

O inverno de 2000 tem o índice de dano médio mais alto do primeiro subgrupo (58,13), mas não é tão distinto das médias do segundo subgrupo para que seja excluído do mesmo. O outono 2000 tem a média de dano mais baixa (41,63), enquanto que o inverno de 2001 tem a média mais alta (64,75). O verão e o inverno, estações extremas opostas, tendem a separar-se.

No teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch F, há a separação de três subgrupos, pois trata-se de um teste estatístico mais sensível. São eles:

Outono 2000	Verão 1999/2000	Verão 2000/2001
Verão 1999/2000	Outono 2001	Inverno 2000
Outono 2001	Primavera 2000	Primavera 2001
Primavera 2000	Verão 2000/2001	Inverno 2001
Verão 2000/2001	Inverno 2000	
Inverno 2000	Primavera 2001	

Aqui as estações extremas, verão e inverno, separam-se visivelmente pelos índices de dano obtidos no teste Cometa com *G. tigrina*. Juntando-se as médias dos dois invernos e dos dois verões conclui-se que no inverno ($X=61,44$) o índice de dano é bem mais alto do que no verão ($X=43,63$).

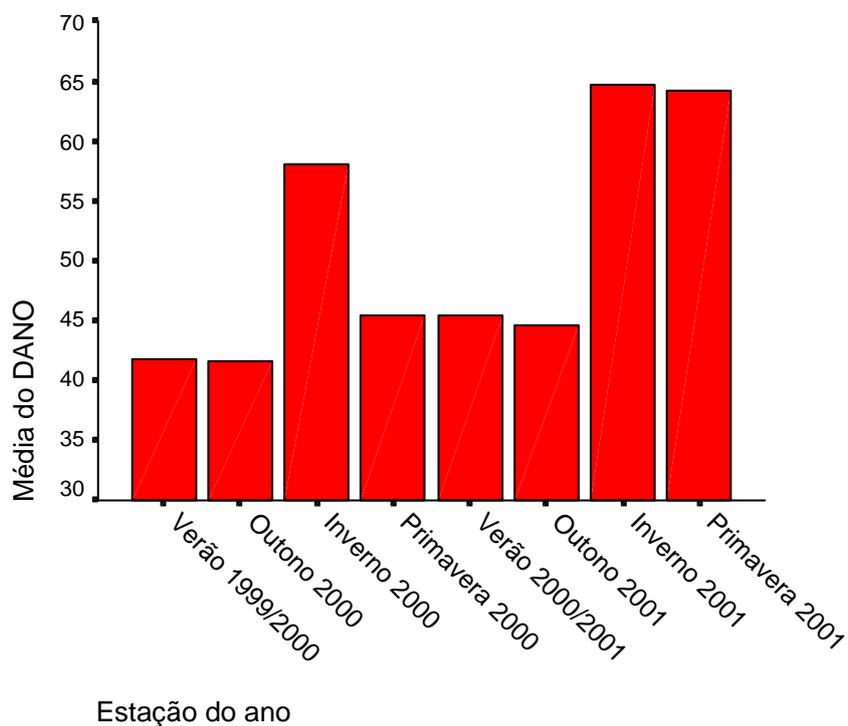


Gráfico 4. Médias dos danos obtidas nas diferentes estações do ano. Nota-se a separação das estações extremas, inverno e verão.

III.3.1.5. Comparação dos Resultados Obtidos no Ano 2000 com o Obtido em 2001

Os dois anos de coleta, 2000 e 2001, foram comparados em virtude da diferença entre os resultados obtidos nas estações para a variável índice de dano ($p=0,009$) já apresentada no item acima, embora não tenha sido detectado nada além de uma tendência nas diferenças quanto à variável mais importante, dano menos controle negativo ($p=0,066$). Como já dito no início dos resultados, a variável índice de dano é aceitável para ser trabalhada do ponto de vista estatístico. Por esses motivos a comparação entre os diferentes anos de coleta foi feita usando-se as duas variáveis, índice de dano (DANO) e índice de dano menos controle negativo (DELTANEG). Os resultados estão mostrados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para verificação da diferença das respostas obtidas por ano de coleta no teste Cometa em *G. tigrina* quanto aos parâmetros índice de dano (DANO) e índice de dano menos controle negativo (DELTANEG).

Descrições									
		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança de 95% para a Média		Mínimo	Máximo
						Limite Inferior	Limite Superior		
DANO	ano 2000	32	46,72	16,99	3,00	40,59	52,84	18,00	90,00
	ano 2001	32	54,75	17,95	3,17	48,28	61,22	24,00	94,00
	Total	64	50,73	17,80	2,22	46,29	55,18	18,00	94,00
DELTANEG	ano 2000	32	28,07	16,62	2,94	22,08	34,06	-1,00	68,40
	ano 2001	32	30,86	17,45	3,08	24,57	37,15	2,50	66,00
	Total	64	29,46	16,96	2,12	25,23	33,70	-1,00	68,40

Teste de Homogeneidade de Variâncias				
	EStatística de Levene	df1	df2	Sig.
DANO	,171	1	62	,681
DELTANEG	,148	1	62	,702

ANOVA						
		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
DANO	Entre Grupos	1032,02	1	1032,02	3,380	,071
	Dentro dos Grupos	18928,47	62	305,30		
	Total	19960,48	63			
DELTANEG	Entre Grupos	124,60	1	124,60	,429	,515
	Dentro dos Grupos	17997,25	62	290,28		
	Total	18121,85	63			

Não há diferença entre os resultados obtidos nos dois anos de coleta para os parâmetros testados, índice de dano ($p=0,071$) e dano menos controle negativo ($p= 0,515$). O resultado para o parâmetro índice de dano mostra uma tendência de diferença entre os anos de 2000 e 2001. Embora a diferença não tenha sido importante estatisticamente, a média dos parâmetros obtidos em 2000 ($X=46,72$) é mais baixa do que o obtido em 2001 ($X=54,75$).

III.3.1.6. Comparação do Índice de Dano Menos Controle Negativo (DELTANEG) com a Pluviosidade

A pluviosidade total foi coletada no pluviômetro localizado na Av. Cristiano Fischer 1297 (LATITUDE 30.01 SUL; LONGITUDE 51.13 OESTE) e os dados gentilmente cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Este é o único aparelho de medição da região metropolitana de Porto Alegre e o parâmetro coletado é considerado representativo numa área de 100 Km de raio em relação ao pluviômetro.

Além da temperatura, a pluviosidade também caracteriza as estações e pode ter influência sobre o potencial genotóxico detectado no Lago Guaíba. Os períodos de coleta variaram nas estações levando de uma semana, em média, até três semanas para a coleta das amostras em todos os pontos. Por isso, consideramos importante como parâmetro a pluviosidade total diária de uma semana antes da coleta até o último dia da amostragem da estação (ver **Tabela 4** Material e Métodos).

Na **Tabela 14** constam os índices pluviométricos totais dos períodos de interesse em milímetros (mm). Foi realizado o teste de correlação de Pearson entre o índice pluviométrico total do período e o índice de dano menos controle negativo total da estação. Não há correlação entre o índice pluviométrico e o ID – C- totais do período ($r=0,201$; $p=0,634$) (ver Discussão).

Tabela 14. Índices pluviométricos totais em relação ao período de coleta e índice de dano menos controle negativo total da estação.

ESTAÇÃO	PERÍODO DE COLETA		ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO TOTAL DO PERÍODO (mm)	ID – C- DA ESTAÇÃO DO ANO
	AMOSTRAGEM	DO ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO		
VERÃO 1999/2000	26/01 A 17/02/2000	19/01 A 17/02/2000	40,4	290
OUTONO 2000	17/05 A 25/05/2000	10/05 A 25/05/2000	29,0	157
INVERNO 2000	10/08 A 30/08/2000	03/08 A 30/08/2000	93,9	297
PRIMAVERA 2000	07/11 A 17/11/2000	01/11 A 17/11/2000	59,3	218
VERÃO 2000/2001	07/02 A 19/02/2001	31/01 A 19/02/2001	37,6	181
OUTONO 2001	07/05 A 16/05/2001	30/04 A 09/05/2001	15,5	251
INVERNO 2001	07/08 A 15/08/2001	31/07 A 15/08/2001	4,6	270
PRIMAVERA 2001	06/11 A 14/11/2001	30/10 A 14/11/2001	65,4	222

III.3.1.7. Comparação do Índice de Dano Menos Controle Negativo (DELTANEG) com Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos coletados e disponibilizados pelo Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE) foram comparados aos dados do monitoramento do potencial genotóxico da bacia do Guaíba com *G. tigrina*. As leituras de tais parâmetros estão nas tabelas em **ANEXO 1**. Nestas tabelas os parâmetros físico-químicos obtidos estão separados por ponto e data de coleta para facilitar a leitura e entendimento dos dados. A listagem completa dos códigos para as variáveis usadas consta no **ANEXO 2**.

Para o entendimento das relações entre esses parâmetros físico químicos foram realizados testes de correlação e análise fatorial. Os 38 parâmetros físico-químicos coletados pelo DMAE e o parâmetro coletado pelo INMET foram correlacionados com a variável de interesse índice de dano menos controle negativo (DELTANEG). Tais correlações, quando significantes, indicam que há associação entre as variáveis testadas, ou seja, elas variam juntas, de forma negativa ou positiva. Quanto maior é o coeficiente de correlação r , maior é a intensidade de associação entre os parâmetros. As tabelas de correlação estão em **ANEXO 3**.

Houve correlação significativa entre DELTANEG e RT105 (RESÍDUO TOTAL A 105°C) ($r=0,278$), RF550 (RESÍDUO TOTAL FIXO A 550°C) ($r=0,254$), COND (CONDUTIVIDADE) ($r=0,267$), CLORETO ($r=0,300$), NORG (NITROGÊNIO ORGÂNICO) ($r=0,340$) e FP (FLAGELADOS PIGMENTADOS) ($r=0,293$).

Os resíduos, condutividade e cloreto afetam a biodisponibilidade de mutagênicos aos organismos aquáticos. O nitrogênio orgânico reflete a fixação bacteriana nas raízes de plantas aquáticas e a maneira como outros organismos se relacionam nas cadeias tróficas com tais plantas compondo o ciclo do nitrogênio. Os flagelados pigmentados se correlacionam com o índice de dano menos controle negativo por serem organismos adaptáveis a condições variáveis no ambiente, podendo realizar fotossíntese ou não, em dependência de fatores como nitrogênio orgânico, dióxido de carbono, etc.

Para entender-se como estes fatores interagem foi usada a análise fatorial pelo método de análise dos componentes principais. A rotação Varimax foi aplicada para aperfeiçoar a interpretação dos fatores tomados na extração parcial e total.

Na **Tabela 15** está a matriz de componentes principais rotados. Os grupamentos podem ser visualizados na matriz. Seguindo-se as colunas da matriz vê-se o grupamento do primeiro componente, que vai de *Escherichia coli* até zinco. O segundo componente está agrupado na segunda coluna e reúne as variáveis cloreto, resíduo fixo, condutividade e resíduo total. O terceiro componente, na terceira coluna, junta a temperatura do ar, a temperatura da água e o pH. O quarto componente, na coluna quatro, reúne pluviosidade total e nitrogênio orgânico. O componente 5 é o alumínio e nitrito. O componente 6 é o resíduo volátil, e por fim o componente 7 é o nitrato e número total de plâncton.

Tabela 15. Matriz dos componentes principais rotados agrupando as diversas variáveis físico-químicas.

Matriz dos Componentes Rotados ^a

	Componentes						
	1	2	3	4	5	6	7
ECOLI	,961	,133	-,040	,006	-,108	,072	-,039
PO4O	,959	,171	-,028	-,099	-,026	,040	-,002
COLTOTAL	,938	,086	-,202	,101	,016	,023	-,039
NH3	,899	,226	,058	-,201	-,040	,127	,076
PO4T	,897	,134	,011	-,102	-,015	,086	-,060
DQO	,893	,183	-,070	-,235	,009	,106	,001
DBO	,831	-,024	-,005	,181	-,033	-,023	-,097
OD	-,786	-,129	-,195	,207	-,397	-,055	,029
ALCT	,784	,189	-,069	,113	,053	-,119	,106
DUREZA	,691	,307	,020	,025	,158	-,136	,415
ABS	,601	,005	-,476	,285	,338	-,037	,069
ZN	,521	-,187	,043	-,286	,426	,171	-,047
CLORETO	,300	,898	-,006	-,096	,189	-,017	-,003
RF550	,101	,888	,028	,004	-,207	,304	,020
COND	,405	,844	,000	,011	,068	,021	-,005
RT105	,059	,728	-,062	,049	-,223	,618	-,022
TEMPAR	,026	-,005	,932	,061	,059	-,116	,065
TEMPAG	-,073	-,004	,927	,135	,097	-,015	-,058
PH	-,111	-,205	,390	,805	-,155	-,081	,120
PLUVTOT	,185	,087	-,005	,778	,222	,321	,198
NORG	,403	-,096	,109	-,551	-,084	,267	,434
AL	-,006	,120	,164	-,152	-,719	,341	-,039
NO2	-,067	,103	,382	-,028	,699	,009	,101
RV550	-,014	,295	-,161	,094	-,176	,846	-,070
NO3	-,369	-,024	-,002	,346	-,183	-,385	,315
NTOTPLA	-,055	-,008	-,006	,150	,102	-,084	,893

Método de Extração: Análise de Componentes Principais.

Método de Rotação: Varimax com normalização de Kaiser.

^a. Rotação converge em 15 iterações

O teste não paramétrico de correlação de Spearman é significativo para o fator 2 ($r=0,360$; $p=0,024$), para o fator 3 ($r=0,319$; $p=0,048$) e para o fator 7 ($r=0,356$; $p=0,026$). Os demais fatores não têm correlação significativa com DELTANEG. Abaixo estão mostrados os gráficos que distribuem os valores de DELTANEG em relação aos fatores 2, 3 e 7. Os pontos 38 e 40 não aparecem nos gráficos porque houve muitos valores perdidos no teste estatístico pelos parâmetros não coletados nestes pontos.

A correlação dos resultados do teste Cometa em planárias com estes fatores é facilmente explicada.

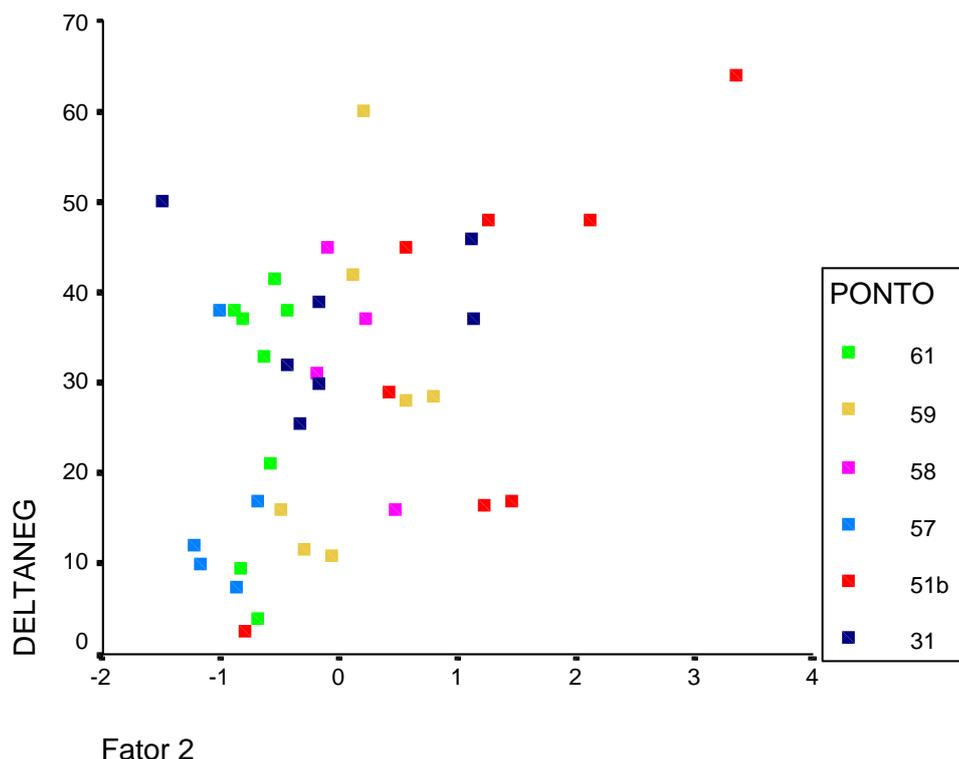


Gráfico 6. Os valores de índice de dano menos controle negativo dos pontos plotados em relação ao fator 2 (ver Tabela15).

O fator 2, designado Fator Físico e Químico, inclui os resíduos que disponibilizam as mais variadas substâncias para o ambiente aquático, aumentando a condutividade, que representa o teor de sais e esta, conseqüentemente, ligada aos cloretos. Os compostos relacionados ao cloro incluem alguns sabidamente mutagênicos e carcinogênicos. Nota-se a separação dos pontos em grupos. Quanto maior é o dano obtido nos pontos, mais acima eles estão em relação ao eixo X. A distribuição em relação ao eixo y evidencia as correlações negativas à esquerda de zero, a ausência de correlação com o fator (0) e as correlações positivas com o fator à direita de zero. Os rios Caí, ponto 57, e Gravataí, ponto 31, que possuem os maiores potenciais genotóxicos, têm a maioria dos pontos agrupados acima no eixo X devido à correlação com o fator Físico e Químico.

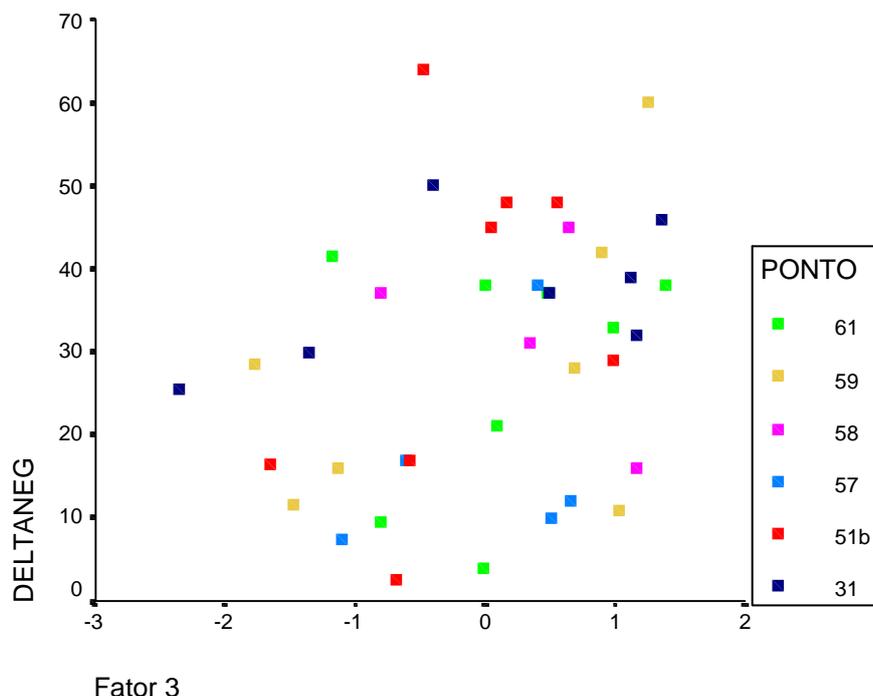


Gráfico 7. Os valores de índice de dano menos controle negativo dos pontos plotados em relação ao fator 3 (ver Tabela15).

O fator 3, chamado Temperatura, agrupa a temperatura do ar e da água, correlacionando-se aos dados biológicos positivos obtidos que variam conforme as estações do ano. Ou seja, há variações sazonais importantes no potencial genotóxico das amostras de águas da bacia do Guaíba relacionados à temperatura.

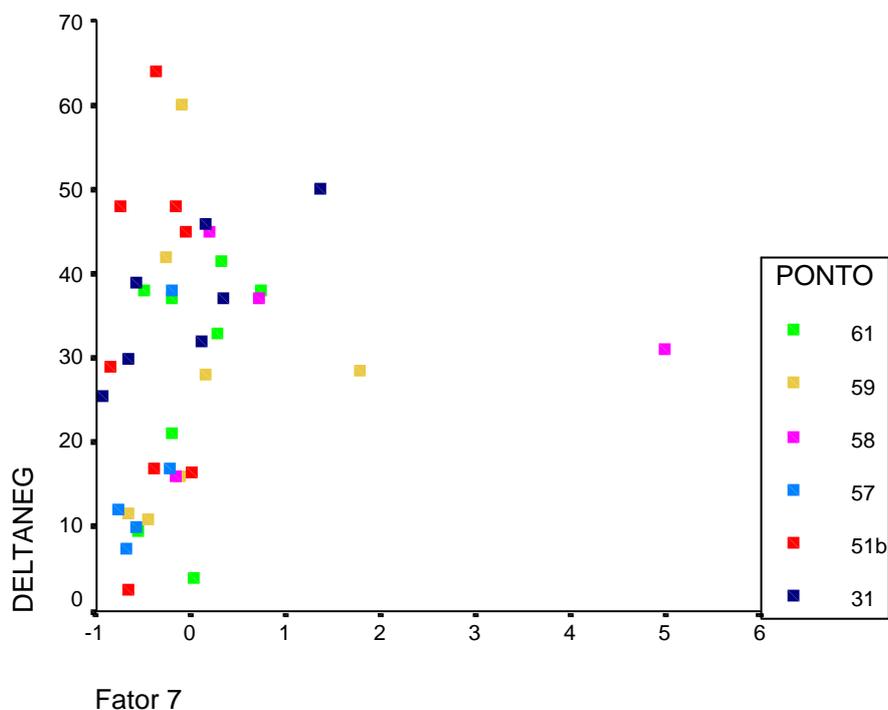


Gráfico 8. Os valores de índice de dano menos controle negativo dos pontos plotados em relação ao fator 7 (ver Tabela15).

Por fim, o fator 7, nomeado Biomassa, correlaciona-se com DELTANEG porque a alta quantidade de nitrato representa um importante nutriente dissolvido para o plâncton, o que aumenta a metabolização do nitrogênio presente no ambiente, formando radicais livres que podem ser responsáveis por danos oxidativos.

III.3.2. Comparação da Sensibilidade entre *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* Mixoplóide

Ao longo de muitos anos de pesquisas com as planárias acumulados muitos dados sobre a sensibilidade de *G. schubarti* e *G. tigrina* a genotóxicos de referência como o Metil Metanossulfonato (clastogênico de ação direta) a Ciclofosfamida (clastogênico dependente de metabolização) e radiação γ (agente físico causador de quebras simples e duplas no DNA) (Lau, 1998). Os trabalhos mais recentes do nosso grupo de pesquisa se referem a sensibilidade de *G. schubarti* mixoplóide (Guecheva, 2001; Jaeger 2001, dados não publicados).

Tendo acumulado tantos resultados positivos em testes de genotoxicidade, o nosso grupo de pesquisa está iniciando uma investigação acerca da comparação entre as sensibilidades das planárias usadas em tais testes. Para verificar se as diferentes espécies de planárias nativas do Rio Grande do Sul apresentam sensibilidades similares ou diferentes entre elas, foram testadas em três grupos: *G. tigrina*, *G. schubarti* (2n) e *G. schubarti* mixoplóide (2n/3n). Estas comparações foram feitas em duas coletas, verão 2000/2001 e inverno 2001. Os resultados são apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Comparação das sensibilidades de *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide através do teste Cometa.

ESPÉCIE	LOCAL	PONTO	ESTAÇÃO	ID	C-	C+	ID-C-
<i>G. tigrina</i>	Gravataí	31	Verão00/01	52	13	78	39
<i>G. tigrina</i>	Jacuí	57	Verão00/01	47	13	78	34
<i>G. tigrina</i>	Caí	58	Verão00/01	67	13	78	54
<i>G. tigrina</i>	Sinos	59	Verão00/01	24	13	78	11
<i>G. tigrina</i>	Ponta da Cadeia	38	Verão00/01	48	13	78	35
<i>G. tigrina</i>	Dilúvio	40	Verão00/01	33	13	78	20
<i>G. tigrina</i>	Guaíba R	51b	Verão00/01	42	13	78	29
<i>G. tigrina</i>	Guaíba LP	61	Verão00/01	51	13	78	38
<i>G. schubarti</i>	Gravataí	31	Verão00/01	48	21	175	27
<i>G. schubarti</i>	Jacuí	57	Verão00/01	72	21	175	51
<i>G. schubarti</i>	Caí	58	Verão00/01	42	21	175	21
<i>G. schubarti</i>	Sinos	59	Verão00/01	58	21	175	37
<i>G. schubarti</i>	Ponta da Cadeia	38	Verão00/01	46	21	175	25
<i>G. schubarti</i>	Dilúvio	40	Verão00/01	54	21	175	33
<i>G. schubarti</i>	Guaíba R	51b	Verão00/01	54	21	175	33
<i>G. schubarti</i>	Guaíba LP	61	Verão00/01	39	21	175	18
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Gravataí	31	Verão00/01	50	21	168	29
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Jacuí	57	Verão00/01	23	21	168	2
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Caí	58	Verão00/01	64	21	168	43
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Sinos	59	Verão00/01	31	21	168	10
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Ponta da Cadeia	38	Verão00/01	44	21	168	23
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Dilúvio	40	Verão00/01	40	21	168	19
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Guaíba R	51b	Verão00/01	69	21	168	48
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Guaíba LP	61	Verão00/01	77	21	168	56
<i>G. tigrina</i>	Gravataí	31	Inverno 01	78	28	171	50
<i>G. tigrina</i>	Jacuí	57	Inverno 01	57	28	171	29
<i>G. tigrina</i>	Caí	58	Inverno 01	67	28	171	39
<i>G. tigrina</i>	Sinos	59	Inverno 01	44	28	171	16
<i>G. tigrina</i>	Ponta da Cadeia	38	Inverno 01	37	28	171	09
<i>G. tigrina</i>	Dilúvio	40	Inverno 01	94	28	171	66
<i>G. tigrina</i>	Guaíba R	51b	Inverno 01	92	28	171	64
<i>G. tigrina</i>	Guaíba LP	61	Inverno 01	49	28	171	21
<i>G. schubarti</i>	Gravataí	31	Inverno 01	48	19	151	29
<i>G. schubarti</i>	Jacuí	57	Inverno 01	49	19	151	30
<i>G. schubarti</i>	Caí	58	Inverno 01	54	19	151	35
<i>G. schubarti</i>	Sinos	59	Inverno 01	74	19	151	55
<i>G. schubarti</i>	Ponta da Cadeia	38	Inverno 01	68	19	151	49
<i>G. schubarti</i>	Dilúvio	40	Inverno 01	56	19	151	37
<i>G. schubarti</i>	Guaíba R	51b	Inverno 01	74	19	151	55
<i>G. schubarti</i>	Guaíba LP	61	Inverno 01	53	19	151	34
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Gravataí	31	Inverno 01	33	16	118	17
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Jacuí	57	Inverno 01	29	16	118	13
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Caí	58	Inverno 01	67	16	118	51
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Sinos	59	Inverno 01	44	16	118	28
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Ponta da Cadeia	38	Inverno 01	62	16	118	46
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Dilúvio	40	Inverno 01	70	16	118	54
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Guaíba R	51b	Inverno 01	33	16	118	17
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	Guaíba LP	61	Inverno 01	65	16	118	49

O teste estatístico ANOVA para comparação da sensibilidade entre os três grupos testados é apresentado na **Tabela 17**.

Tabela 17. Testes estatísticos para comparação de sensibilidade entre espécies.

Descrições

DELTANEG

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Intervalo de Confiança de 95%		Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite Superior		
<i>G. tigrina</i>	16	34,63	17,39	4,35	25,36	43,89	9,00	66,00
<i>G. schubarti</i>	16	35,56	11,47	2,87	29,45	41,68	18,00	55,00
<i>G. schubarti mixoplóide</i>	16	31,56	17,80	4,45	22,08	41,04	2,00	56,00
Total	48	33,92	15,57	2,25	29,39	38,44	2,00	66,00

Teste de Homogeneidade de Variâncias

DELTANEG

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
2,881	2	45	,066

ANOVA

DELTANEG

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	140,04	2	70,02	,280	,757
Dentro dos Grupos	11257,63	45	250,17		
Total	11397,67	47			

As variâncias são homogêneas para a variável índice de dano menos controle negativo (ID - C-) por espécie segundo Levene ($p=0.066$). Não há diferenças significativas entre as planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide segundo ANOVA ($p=0.757$). A diferença foi também testada por amostras pareadas. Os resultados são apresentados na tabela seguinte.

Tabela 18. Teste t para amostras pareadas para verificar a diferença entre as sensibilidades das planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide em relação à variável de interesse ID – C-.

Teste de Amostras Pareadas									
		Diferenças Pareadas							
		Média	Desvio Padrão	Erro Padrão Médio	Intervalo de Confiança de 95% para a Diferença		t	df	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Pair 1	tigrina - schubarti	-,94	22,42	5,60	-12,88	11,01	-,167	15	,869
Pair 2	tigrina - mix	3,06	23,19	5,80	-9,29	15,42	,528	15	,605
Pair 3	schubarti - mix	4,00	23,97	5,99	-8,77	16,77	,668	15	,515

Como não há diferenças significativas entre as respostas dos três grupos testados, os dados obtidos a partir de qualquer destes grupos são comparáveis entre si.

Os testes estatísticos realizados a partir de agora, serão meras repetições das hipóteses já testadas para o monitoramento do Guaíba com *G. tigrina*.

III.3.2.1. Índice de Dano (ID) das Águas Testadas

Mesmo não havendo diferenças entre as sensibilidades da planárias no teste Cometa, é necessário avaliar se as respostas das espécies são positivas ou negativas. A comparação entre as variáveis índice de dano e controle negativo traz este resultado. Foi realizado o teste t para amostras pareadas entre ID e C- para cada uma das espécies. Os resultados são mostrados na tabela que se segue:

Tabela 19. Resultado do teste t de amostras pareadas para verificar a diferença entre o índice de dano e o controle negativo nas planárias pertencentes aos três grupos testados.

Par ID & C- Espécie	Teste t		
	t	df	Sig.
<i>G. tigrina</i>	7,966	15	0,000
<i>G. schubarti</i>	12,40	15	0,000
<i>G. schubarti</i> mixoplóide	7,095	15	0,000

Os resultados foram significantes. *G. tigrina* respondeu de forma positiva à indução de danos no DNA pelas águas da bacia hidrográfica do Guaíba (p=0,000). Da mesma forma *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide sofreram danos significativos no DNA quando expostas às águas da bacia do Guaíba, sendo a significância igual para ambas (p=0,000).

Portanto, as águas da bacia hidrográfica do Guaíba induziram danos no DNA de *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide, sendo os três grupos de planárias igualmente suscetíveis ao potencial genotóxico das águas do manancial. Podem ser usadas quaisquer destas três espécies para avaliação do potencial genotóxico de águas, pois as três são sensíveis para avaliação de amostras ambientais que se caracterizam como misturas complexas.

III.3.2.2. Comparação entre as Estações do Ano

As águas para este teste de sensibilidade foram coletadas nos oito pontos amostrais no verão de 2000/2001 e no inverno de 2001. Nos resultados obtidos no monitoramento com *G. tigrina* já foi verificada a diferença entre as estações extremas. Pode-se fazer novamente tal comparação, utilizando-se desta vez os dados deste experimento de sensibilidade.

Foi realizado o teste de ANOVA para verificar se há diferença entre o verão e o inverno quanto à variável índice de dano menos controle negativo para cada um dos três grupos-teste: *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide.

Os resultados para os três grupos testados foram reunidos na mesma tabela.

Tabela 20. Resumo da estatística para a comparação entre as estações verão 2000/2001 e inverno 2001 quanto à variável ID – C- agrupadas por espécie.

COMPARAÇÃO	ESPÉCIE	X	DP	Homogeneidade de σ^2	ANOVA Sig.
Verão 2000/2001 & Inverno 2001	<i>G. tigrina</i>	32,50 36,75	12,95 21,67	0,080	0,641
Verão 2000/2001 & Inverno 2001	<i>G. schubarti</i>	30,63 40,50	10,45 10,82	0,576	0,085
Verão 2000/2001 & Inverno 2001	<i>G. schubarti</i> mixoplóide	28,75 34,38	18,94 17,37	0,923	0,546

As variâncias são homogêneas e não há diferença entre o verão 2000/2001 e o inverno 2001 quanto à variável de interesse ID – C- em nenhuma das três espécies testadas, embora seja próxima à significância entre verão e inverno em *G. schubarti* ($p=0,085$) tendo o inverno apresentado dados superiores.

Por não ter havido diferença entre as sensibilidades dos três grupos de planárias testadas, a distinção entre as duas estações extremas, verão e inverno, pode ser verificada tomando-se os dados obtidos para os três grupos-teste em conjunto.

Tabela 21. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para testar a diferença entre o verão entre 2000 e 2001 e o inverno de 2001 quanto à variável de interesse ID – C- tomando-se os dados dos três grupos de planárias em conjunto.

Descrições

DELTANEG

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança de 95% para a Média		Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite Superior		
Verão 2000/2001	24	30,63	14,00	2,86	24,71	36,54	2,00	56,00
Inverno 2001	24	37,21	16,64	3,40	30,18	44,24	9,00	66,00
Total	48	33,92	15,57	2,25	29,39	38,44	2,00	66,00

Teste de Homogeneidade de Variâncias

DELTANEG

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
1,502	1	46	,227

ANOVA

DELTANEG

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	520,08	1	520,08	2,199	,145
Dentro dos Grupos	10877,58	46	236,47		
Total	11397,67	47			

As variâncias são homogêneas ($p=0,227$) e não há diferenças significativas entre o verão e o inverno para a variável ID – C- ($p=0,145$), agrupando-se todas as três espécies testadas.

O mesmo teste foi realizado em relação à variável índice de dano.

Tabela 22. Homogeneidade de variâncias e ANOVA para testar as diferenças entre as estações quanto aos índices de dano induzidos tomando-se os dados dos três grupos-teste em conjunto.

Descrições

DANO

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança de 95% para a Média		Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite Superior		
Verão 2000/2001	24	48,96	14,15	2,89	42,98	54,93	23	77
Inverno 2001	24	58,21	17,53	3,58	50,81	65,61	29	94
Total	48	53,58	16,44	2,37	48,81	58,36	23	94

Teste de Homogeneidade de Variâncias

DANO

Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
1.621	1	46	,209

ANOVA $p=0,05015175044537$

DANO

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	1026,75	1	1026,75	4,046	,050
Dentro dos Grupos	11672,92	46	253,76		
Total	12699,67	47			

O resultado foi $p=0,05$, no limite da significância. Portanto, a diferença entre o verão e o inverno é discutível quando usa-se a variável índice de dano para a mensuração. Esta diferença no resultado da comparação é devida ao uso de variáveis diferentes no teste estatístico, índice de dano menos controle negativo ou somente o índice de dano, mas como mencionado anteriormente, ambas as variáveis são aceitáveis para avaliação dos resultados.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney também foi aplicado, para comparação com a resposta do paramétrico ANOVA.

Ranks

	Estação	N	Rank Médio	Soma dos Ranks
índice de Dano	Verão 2000/2001	24	20,75	498,00
	Inverno 2001	24	28,25	678,00
	Total	48		

Teste Estatístico ^a	
	DANO
Mann-Whitney U	198,00
Wilcoxon W	498,00
Z	-1,857
Sig. Assintótica (bilateral)	,063
Sig. Exata (bilateral)	,064
Sig. Exata (unilateral)	,032
Probabilidade Pontual	,001

^a. Grupamento Variável: estação do ano

A diferença bilateral não é significativa ($p=0,063$), mas é discutível. A diferença avaliada por um teste unilateral é significativa ($p=0,032$). Diante da discussão estatística, a significância biológica do resultado deve prevalecer na decisão (ver Discussão).

Cabe enfatizar que nos dados obtidos nos dois anos de monitoramento com *G. tigrina* houve diferença significativa entre as estações do ano em relação à variável índice de dano ($p=0,009$) (ver **Tabela 12**).

III.3.3. Teste de Ames

A análise estatística para comparação dos resultados obtidos pelo laboratório GENOTOX no teste de Ames nos pontos e datas de coleta coincidentes com os avaliados nesta tese, será apresentada na Discussão.

III.3.4. Testes Piloto para a Padronização do Monitoramento do Ar *in Loco* Através do Teste *Tra*-SHM

Foram realizados testes piloto para a padronização do monitoramento do ar *in loco* através do teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* (*Tra*-SHM). Tais testes exigem várias repetições até que todos os parâmetros e variáveis sejam controlados. Os testes iniciais exigem contagens precisas do número de pêlos estaminais das flores de *Tradescantia* clone 4430 e a análise do nível basal de eventos mutacionais. Essas contagens servem para estabelecer-se um controle histórico que servirá como parâmetro de comparação para verificar a resposta dos testes nos locais a serem monitorados. Portanto como resultados nos testes preliminares obtivemos:

1. Controle negativo histórico do estoque de *Tradescantia* clone 4430;
2. Determinação do número médio de pêlos estaminais da população estoque;
3. Teste para avaliação do pico de mutações em pêlo estaminal após 7^o, 8^o, 9^o e 10^o dias de recuperação após exposição das inflorescências no ponto localizado na confluência da Av. Ipiranga com Silva Só;

Para obter-se o controle negativo histórico da nossa população de *Tradescantia* clone 4430 foram contados os pêlos dos seis estames de sete flores em duas coletas distintas.

Na **Tabela 23** têm-se os resultados das análises para determinação do controle negativo histórico da primeira coleta.

Tabela 23. Resultados da contagem de pêlos e eventos mutacionais da primeira coleta em sete flores de *Tradescantia* clone 4430.

Controle negativo histórico de mutações em pêlos estaminais do estoque de <i>Tradescantia</i> clone 4430			
	Número de pêlos por estame	Total de pêlos por flor	Mutações
Flor 1	36+35+23+34+26+36	190	-
Flor 2	47+57+51+48+40+55	318	-
Flor 3	53+49+40+47+40+40	269	1M
Flor 4	47+46+61+32+41+45	272	-
Flor 5	38+42+33+33+38+35	219	-
Flor 6	31+34+31+32+36+40	204	-
Flor 7	35+42+33+33+46+34	223	-
		Total 1695	
Média de pêlos por flor nesta contagem = 242,14			
1 mutação em 1695 pêlos mut./1000 = 0,59 ($\cong 6 \times 10^{-4}$)			

Como resultado desta análise obtivemos várias leituras do número total de pêlos por flor. A média do número total de pêlos por flor foi de 242,14. Os resultados da segunda coleta estão detalhados na tabela a seguir.

Tabela 24. Resultados da contagem de pêlos e eventos mutacionais da segunda coleta em sete flores de *Tradescantia* clone 4430.

	Número de pêlos por estame	Total de pêlos por flor	Mutações
Flor 1	44+43+43+34+45+33	242	-
Flor 2	46+45+42+41+31+39	251	-
Flor 3	51+39+33+45+34+41	243	-
Flor 4	39+43+36+35+44+32	229	-
Flor 5	42+41+44+39+47+49	269	1M
Flor 6	36+34+58+58+44+58	288	-
Flor 7	34+26+36+51+51+44	242	-
		Total 1764	

Média de pêlos por flor nesta contagem = 252

1 mutação em 1764 pêlos mut./1000 = 0,57 ($\cong 6 \times 10^{-4}$)

Portanto temos:

Média de pêlos por flor na primeira contagem = 242,14

+

Média de pêlos por flor na segunda contagem = 252

=

Número médio de pêlos por flor = 247

Este, portanto, foi o primeiro parâmetro obtido na realização dos testes de monitoramento do ar *in loco*. As contagens de eventos mutacionais do controle negativo histórico é baseada no número médio total de pêlos estaminais (247). No entanto, há recomendação de contagem de eventos e pêlos estaminais em 3 flores por teste e extrapolação do número médio de pêlos para 7 flores ao invés de usar-se este número médio de pêlos (Ma, Saldiva e Rodrigues, 1998).

Para o controle negativo histórico foi determinado o valor de 0,58 mutações por mil pêlos examinados, ou seja, a média dos valores obtidos na primeira (0,59) e segunda coletas (0,57).

Como as condições de cultivo ainda precisam ser otimizadas, têm-se um número reduzido de plantas e portanto, de inflorescências, para poder-se realizar testes. Para cada ponto de monitoramento do ar são necessárias cerca de 25 inflorescências, para garantir-se o número de 7 flores abertas no tempo de recuperação avaliado como o mais adequado para a contagem dos eventos mutacionais. Este parâmetro também deve ser fixado ao longo de vários experimentos, o que exige uma produção elevada de inflorescências.

No teste realizado foram expostas 15 inflorescências no ponto localizado na Av. Silva Só com a Av. Ipiranga. Este ponto foi considerado importante para o monitoramento porque há um grande trânsito de veículos por minuto neste local na cidade de Porto Alegre, principalmente no início da manhã e à tardinha. A exposição iniciou às 18 horas e terminou às 8:00 h da manhã do dia seguinte, totalizando 14 horas (ver Material e Métodos).

As inflorescências expostas foram mantidas em câmara com temperatura controlada de 21° C para recuperação com aeração constante. As leituras foram realizadas nas flores abertas no 7°, 8° e 10° dia de recuperação, já que no nono dia não havia flores abertas. Na **Tabela 25** constam os resultados de tais leituras.

Tabela 25. Leitura do número de eventos mutacionais induzidos em *Tradescantia* clone 4430 expostas no ponto localizado na Av. Silva Só esquina com Av. Ipiranga no bairro Petrópolis em Porto Alegre.

Dias de recuperação	Mutações e localização no pêlo estaminal / flor							Total de mutações / total de pêlos	Mutações / 1000
	1	2	3	4	5	6	7		
7°	1M	1M	1P	1P				4 / 988	4,0
8°	0	1M	4 ^{2M} _{1P} 1P	0				5 / 988	5,1
9°	NÃO HAVIA FLOR ABERTA								–
10°	1P							1 / 247	4,0

Os resultados mostram que não há diferenças significantes entre o sétimo e o décimo dia de recuperação, por ter sido detectado índices similares de mutações por mil pêlos. O experimento não progrediu com sucesso e a amostra avaliada foi muito pequena e, portanto, insuficiente para fixar este parâmetro. São necessários mais testes piloto para obter o dia de recuperação onde temos um pico mutacional, e pode ser que não haja diferenças significativas no número de eventos contados nos dias de recuperação. Mais

experimentos serão realizados se for possível otimizar o cultivo e a produção de inflorescências for suficiente.

Como resultado final verificou-se a indução de uma média de 4,5 mutações por mil pêlos estaminais (10:2.223) no ponto de monitoramento localizado na Av. Silva Só com Ipiranga em Porto Alegre em relação ao controle histórico negativo que foi de 0,58/1000 (\cong 6:10.000), indicando o potencial genotóxico do ar neste local ($\chi^2 = 4,09$; $p < 0,05$).

IV. DISCUSSÃO

IV.1. Avaliação da Genotoxicidade Ambiental

Há muitas razões que justificam um bom entendimento dos níveis de exposição e de impacto de substâncias genotóxicas no ambiente. Talvez as mais óbvias refiram-se à carcinogênese (Miller & Miller, 1977). Químicos genotóxicos, em virtude de sua alta reatividade, também podem contribuir para outras respostas tóxicas, incluindo defeitos hereditários através de mutações em células da linhagem germinativa e efeitos teratogênicos. A interferência na reprodução, tanto quanto os efeitos carcinogênicos, podem causar impacto nos organismos em nível populacional. Para verificar tais efeitos é importante mapear mutações específicas relacionadas ao câncer no organismo-teste. Neste contexto foi importante o achado de mutações características no gene *ras* em tumores induzidos por xenobióticos em espécies de peixes (Bailey *et al.*, 1996).

A importância dos danos no DNA como contribuintes para toxicidade irreversível, outra que não o câncer (chamada de síndrome da doença genotóxica) foi evidenciada por Kurelec (1993). Numerosos eventos mutacionais têm sido relatados como prejudiciais à reprodução de organismos (De Flora *et al.*, 1991). Por outro lado, tem sido demonstrado o poder da genotoxicidade na promoção da variabilidade genética. Mutações deletérias dominantes geralmente são selecionadas negativamente, permanecendo no ambiente somente durante algumas poucas gerações, enquanto mutações recessivas podem ficar protegidas nos heterozigotos, compondo a carga genética da população (Wurgler & Kramers, 1992).

A genotoxicidade não se limita a poluentes ambientais exógenos. Danos oxidativos no DNA contribuem, sozinhos, para um nível basal de formação de uma 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina em 130.000 bases de DNA nuclear de ratos (Richter *et al.*, 1988) que é similar ao nível observado em peixes (Mitchelmore *et al.*, 1996). A 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina é uma base rara que causa erros de pareamento e portanto pode contribuir para a formação espontânea de tumores. Além disso, o dano oxidativo no DNA também é relevante como efeito secundário de alguns poluentes, incluindo compostos nitroaromáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que podem produzir espécies reativas de oxigênio através do ciclo de oxi-redução de metabólitos. O impacto de tais danos poderá ser influenciado pela capacidade antioxidante e de reparação do DNA do organismo (Winston & De Guilio, 1991).

Invertebrados são promissores para o monitoramento de efeitos de exposição a genotoxinas nos ambientes aquáticos, pois eles acumulam mais hidrocarbonetos aromáticos policíclicos do que os peixes, como resultado da sua baixa taxa metabólica (Dunn, 1991).

IV.2. As Planárias como Organismos-teste para Avaliação do Potencial Genotóxico de Amostras Ambientais

A avaliação de espécies expostas a genotóxicos no ambiente aquático é complicada. Existem múltiplos poluentes potenciais, freqüentemente encontrados como misturas complexas. Variações sazonais importantes ocorrem, por exemplo, nas condições ambientais, estado hormonal e nutricional dos organismos, e é sabido que tais fatores podem ter uma influência dramática nos sistemas enzimáticos que ativam e detoxificam genotóxicos. A avaliação da genotoxicidade em peixes ou em invertebrados aquáticos, em laboratório ou no meio, pode ser feita em nível molecular ou cromossômico. As planárias se inserem neste contexto. Nas espécies *G. schubarti* e *G. tigrina* foram avaliadas respostas genotóxicas positivas em nível molecular, pelo teste Cometa e através da análise de aberrações cromossômicas, frente aos clastogênicos de referência metil metanossulfonato, ciclofosfamida e radiação γ (Lau, 1998). *G. schubarti* mixoplóide também respondeu de maneira sensível à indução de danos no DNA com sulfato de cobre (Guecheva, 2001) e metil metanossulfonato no teste Cometa, e à análise de aberrações cromossômicas induzidas por radiação γ (Jaeger, 2001, dados não publicados).

As planárias testadas apresentam vantagens para avaliações da genotoxicidade de substâncias e de amostras ambientais:

- I. Apesar de sua primitiva posição filogenética são organismos complexos, com especialização dos elementos histológicos anatômicos (Balavoine & Telford, 1995; Gustafsson, 1998);
- II. Esta especialização celular é reversível, sendo a causa da sua grande capacidade de regeneração. Um fragmento regenera-se em um novo indivíduo, completo e com todos os órgãos funcionais. A planária pode ser cortada em vários pedaços, podendo ser usada uma parte do mesmo organismo em cada dose do tratamento e controle; assim, torna-se controle de si mesma, eliminando diferenças interindividuais que influenciam nas respostas aos tratamentos;
- III. O tecido em regeneração apresenta um alto índice mitótico. Elas possuem poucos cromossomos, grandes e quase sempre todos os pares são identificáveis, sem bandamento. *G. tigrina* tem $2n = 16$ e *G. schubarti* $2n=8$. Populações com estes cariótipos apresentam reprodução sexuada. São hermafroditas, realizando fecundação cruzada. Não há notícias de autofertilização. Há, no entanto, populações triplóides e mixoplóides dessas mesmas espécies. *G. tigrina* com $3n = 24$, *G. schubarti* com $3n=12$ e *G. schubarti* mixoplóide, com células $2n=8$ e células $3n=12$. Estas populações

reproduzem-se somente de forma assexuada. Estes polimorfismos cromossômicos são comuns em planárias (De Vries *et al.*, 1984);

IV. Adaptam-se muito bem às condições de laboratório e seu cultivo, assim como a análise cromossômica é barata e fácil;

V. São altamente sensíveis a agentes genotóxicos e mostram resistência à toxicidade, sobrevivendo à indução de aberrações cromossômicas e quebras no DNA durante o tratamento com drogas e amostras ambientais de águas ou misturas complexas;

VI. A espécie *G. tigrina* é endêmica do Sul do Brasil e facilmente encontrada na natureza, permitindo comparações dos resultados em experimentos controlados de laboratório com avaliações feitas diretamente no ambiente. As planárias são mundialmente distribuídas, e são muito provavelmente encontradas em quaisquer ambientes sem poluição ou pouco poluídos. Dessa forma é possível a seleção de espécies endêmicas que poderão fornecer resultados mais esclarecedores a respeito do impacto ambiental regional, já que as condições climáticas, edáficas, físico-químicas e de biodiversidade, diferem de país a país e de região a região, principalmente se considerarmos a variedade dos ecossistemas brasileiros (Preza, 1995). *G. tigrina* foi selecionada para o monitoramento da bacia hidrográfica do Guaíba porque reproduz-se mais rapidamente e gera mais descendentes do que *G. schubarti* em condições de laboratório. Ambas, como já comentado, reproduzem-se de forma sexuada e isso gera e mantém a variabilidade genética das populações. Já *G. schubarti* mixoplóide reproduz-se de forma assexuada, por divisão transversal do corpo. Essa planária, portanto, gera grandes populações em pouquíssimo tempo, mas, possivelmente, com menor variabilidade genética. Com essas características diferentes, pode-se selecionar espécies adequadas a cada tipo de teste.

Se formos analisar o efeito genotóxico de uma substância nova, que nunca foi avaliada, é adequado usar-se *G. schubarti* mixoplóide, porque estaremos controlando a variável da diferença genética interindividual, que irá influenciar os resultados. Mesmo usando-se *G. tigrina* ou *G. schubarti*, pode-se cortá-las em vários pedaços tornando-as controles de si mesmas. Esta é uma outra forma de eliminar a diferença interindividual.

Existem várias situações onde se pretende identificar indivíduos expostos a agentes potencialmente tóxicos no ambiente. Na maioria das avaliações tende a haver um alto grau de variabilidade interindividual em resposta a agressões químicas. Há fatores endógenos que geram conflito como a idade e características genéticas, além de fatores exógenos como o estado nutricional. Estas características são biomarcadoras de exposição, dose-resposta e suscetibilidade, e esta última é influenciada pelo genótipo e *pool* gênico da população. Indivíduos controle, não expostos, podem exibir um nível de dano mais alto do que indivíduos expostos e alguns indivíduos expostos podem

apresentar índices de dano menores do que os controles. Assim, nestas situações, apenas a média dos valores do grupo pode resolver o problema relacionado à exposição. O dado individual é de uso limitado (Anderson, 2001). Também por esse motivo, além dos outros já citados, selecionamos *G. tigrina* para o monitoramento das águas da bacia do Guaíba. Como descrito na metodologia, foram usados 7 indivíduos com três meses de idade para exposição a cada amostra. Assim, têm-se uma representação da variabilidade genética da população nos testes, a despeito do tamanho amostral reduzido, simulando as condições de exposição que são normalmente encontradas no ambiente.

VII. As planárias são bioindicadoras naturais da qualidade da água. O Instituto de Pesquisa das Planárias (IPP) - UNISINOS, pratica há anos um trabalho de levantamento da qualidade das águas a partir das espécies de planárias ali encontradas. *G. tigrina* é resistente à poluição, sendo encontrada em águas paradas, pantanosas e às vezes poluídas, como no laguinho do Parque Farroupilha (Redenção) em Porto Alegre-RS, mas possui alta sensibilidade genotóxica, o que assegura sua sobrevivência para a realização dos testes;

VIII. No laboratório, os testes controlados realizados com planárias simulam todas as condições de testes *in vitro*, só que são *in vivo*, pois são realizados com organismos íntegros, vivendo similarmente às condições naturais. Segundo Ashby (1991), testes *in vivo* são mais preditivos e precisos que testes *in vitro*. Os linfócitos humanos em cultura são o tipo celular mais popular empregado para monitoramento ambiental (Anderson, 2001) e as planárias *G. schubarti* mixoplóides podem ser empregadas com objetivos semelhantes aos dos estudos em linfócitos humanos, com vantagens a mais: testes com planárias em laboratório perfazem satisfatoriamente as condições dos testes *in vitro* e *in vivo*, com vantagem da sua manutenção ser mais simples e barata do que a de células em cultura.

Até este momento, apenas supúnhamos a aplicabilidade das planárias como organismos-teste para monitoramento ambiental já que haviam respondido bem a mutagênicos de referência (Lau, 1998). No presente trabalho, *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* linhagem mixoplóide responderam de forma positiva à indução de danos no DNA pelas águas da bacia do Guaíba avaliadas pelo teste Cometa. Estes resultados permitem concluir que *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide podem ser usadas como organismos-teste, por sua sensibilidade e todas as vantagens apresentadas acima. Testes adicionais como a análise de aberrações cromossômicas, poderão ser realizados. Há ainda a possibilidade de monitoramento *in situ*, com exposição das planárias nos locais a serem avaliados.

Novos testes, com organismos não pesquisados anteriormente para este fim, exigem a avaliação de certos critérios básicos, para que haja aceitação consensual. São eles: suprimento simples de equipamento; disponibilidade de organismos-teste; reprodutibilidade dos resultados; simplicidade e baixos custos; suprimento abundante de água de qualidade desejada; importância ecológica do efeito testado sobre o organismo; relevância e importância (ecológica ou econômica) do organismo-teste (APHA, 1992 cf. Preza, 1995). As planárias satisfazem todos estes critérios.

III.3. Quebras de Fitas do DNA como Bioindicadoras Sensíveis de Genotoxicidade

Há alguns anos tem sido reconhecido que a exposição a carcinogênicos pode levar à perda da integridade do DNA, e atualmente, há muito interesse na determinação do nível de quebras de fita (*strand breakage* ou SB) como um indicador sensível de genotoxicidade. A produção de SB tem boa correlação com propriedades mutagênicas e carcinogências de poluentes ambientais com estruturas químicas diversas (Sina *et al.*, 1983). Têm sido feitas tentativas para a determinação do fundamento das SBs e a aplicabilidade dessa medida como biomarcador (Mitchelmore & Chipman, 1998), com amostras avaliadas a partir do teste Cometa. Mutações, por si mesmas, são de difícil interpretação, a não ser que as mudanças de bases sejam analisadas de forma específica; mesmo assim, a natureza causal dos eventos mutacionais não é conhecida. Têm sido avaliados adutos carcinogênicos específicos com o uso de anticorpos, por exemplo. Essa informação é importante em relação à modificação inicial do DNA, mas as conseqüências só podem ser admitidas se baseadas no conhecimento de que lesões pré-mutagênicas são apenas potenciais causadoras de câncer. Medidas de adutos específicos também são limitadas no monitoramento ambiental porque os agentes genotóxicos são múltiplos e muitas vezes desconhecidos. O sucesso de técnicas de detecção de adutos genotóxicos para peixes em laboratório e no ambiente tem sido demonstrado, embora seja preciso advertir sobre as limitações da metodologia e dificuldades de interpretação dos resultados (revisão em Mitchelmore & Chipman, 1998).

Quebras simples ou duplas no DNA podem ocorrer através de mecanismos diversos, como via sítios álcali-lábeis (como exemplo os produzidos por radiação ultravioleta, radicais livres de oxigênio e nitrogênio e outros intermediários reativos) e através da ação de enzimas de reparação de excisão. Conseqüentemente, a medida de SB, detectada pelo teste Cometa, oferece meios de avaliação da exposição de organismos a uma ampla gama de genotóxicos químicos que podem modificar o DNA por diferentes meios e é mais sensível do que outros ensaios para avaliação da clastogenicidade, como o teste de micronúcleos

(Pandrangi *et al.*, 1995; Koppen & Verschave, 1996). No entanto, é importante reconhecer que SBs podem ocorrer via mecanismos não relacionados à genotoxicidade direta de um químico. A ativação de enzimas como endonucleases e topoisomerases, através da elevação do nível de cálcio intracelular, por exemplo, pode originar SBs e ainda incrementar o nível de reagentes endógenos como radicais superóxido e óxido nítrico (Meneghini, 1988). Portanto, SBs detectam tanto efeitos diretos de substâncias xenobióticas, quanto refletem o dano do estado redox normal da célula, como demonstrado no teste Cometa em células V79 de hamster chinês e linfócitos humanos (Hartmann & Speit, 1997). Devido a essa não-especificidade que SBs têm limitações na verificação da genotoxicidade de químicos. No entanto, a natureza inespecífica do teste, associada à sensibilidade e aplicabilidade a muitos tipos celulares pode ser considerada favorável para o monitoramento ambiental, desde que seja buscada uma compreensão mais detalhada das causas de qualquer efeito observado através desse método.

Diferentes métodos têm sido usados para a detecção de SBs. Têm sido aplicadas variações de técnicas de sedimentação alcalinas e neutras em gradientes de sucrose. No entanto, estas técnicas despendem muito tempo e não são tão sensíveis quanto o desenovelamento das fitas de DNA por tratamento alcalino, eluição alcalina ou o teste Cometa (Ahnstrom, 1988).

III.4. O Teste Cometa Aplicado à Avaliação do Potencial Genotóxico de Amostras Ambientais

O biomonitoramento é uma área importante dentro das ciências ambientais. Testes de biomonitoramento devem ser rápidos, relativamente baratos, sensíveis e reprodutíveis. Nem todos os testes genéticos cumprem todos esses quesitos. O teste de aberrações cromossômicas e troca entre cromátides-irmãs consomem muito tempo, a técnica para detecção de adutos no DNA tem um alto custo, e o teste de micronúcleos, um dos mais usados, não tem aceitação consensual como instrumento de monitoramento ambiental. Desde que o protocolo da versão alcalina do teste Cometa foi publicado por Singh *et al.* (1988), seu uso tem crescido em diferentes áreas: aplicações clínicas, monitoramento humano, radiobiologia, genética toxicológica e ecotoxicologia genética. A versão alcalina do teste Cometa tem sido amplamente empregada em genética ecotoxicológica. Muitos tipos de organismos como plantas, vermes, moluscos, peixes, anfíbios e mamíferos têm sido usados no teste Cometa. Experimentos *in vitro* e *in vivo* assim como estudos *in situ* têm sido desenvolvidos em vários ambientes (água, ar e solo) (Belpaeme *et al.*, 1998; Tice *et al.*,

2000). Nos artigos de revisão publicados recentemente, o procedimento do teste original foi modificado de acordo com o tipo celular (Belpaeme *et al.*, 1998).

Como um dos objetivos deste trabalho temos a validação do teste Cometa em planárias como candidato para o monitoramento de ecossistemas de água doce. A simplicidade e a sensibilidade do teste Cometa faz dele um sistema de teste adequado para biomonitoramento de organismos expostos de forma crônica. No entanto, os protocolos e as condições experimentais devem ser escolhidos com cuidado.

O teste Cometa, também chamado teste de célula única em gel de eletroforese (SCGE), mede quebras no DNA (SBs) de células únicas em suspensão, diretas ou induzidas por lesões como metilação e adutos, cujo procedimento torna essas anomalias lesões alcalilábeis, detectadas sob as condições do ensaio na sua forma alcalina (Green *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995a). Em contrapartida, os indutores de ligações cruzadas, são menos detectados, provavelmente por estabilizarem a cromatina (Speit & Hartmann, 1996). No entanto, o teste pode se tornar mais sensível de acordo com os parâmetros e protocolos usados (Cotelle & Ferard, 1999).

O teste Cometa se caracteriza pela heterogeneidade das respostas que variam em função das condições do teste (revisão em Fairbairn *et al.*, 1995; revisão em Tice *et al.*, 2000). As condições para o teste Cometa em planárias estão padronizadas, mas isto levou muito tempo e perdemos vários testes por causa de pequenos detalhes técnicos. O modo de preparo da suspensão celular é um detalhe que interfere na qualidade dos testes. O uso da tripsina 0,48% evita o dano ocasionado quando as células são individualizadas através de expedientes mecânicos. A tripsina é uma enzima que faz a digestão de proteínas que mantêm as células do tecido agregadas. Como o teste Cometa exige uma suspensão de células individuais, ela tem sido usada com este intuito. No entanto, sua ação deve ser interrompida após 2 min para evitar a apoptose das células. Isso foi feito adicionando-se soro bovino fetal à suspensão. As proteínas do soro bovino fetal competem com as proteínas do tecido e a tripsina cessa sua ação sobre as células de planárias. Um detalhe importante no uso da tripsina é que deve ser preparada imediatamente antes do início do teste, já que a sua capacidade de ação à temperatura ambiente termina em cerca de duas horas. Da mesma forma, o congelamento da solução de tripsina para uso posterior faz com que ela não tenha a mesma capacidade de degradação de proteínas que possui quando recém preparada, fazendo com que ocorram aglomerações de células na lâmina, que dificultam a análise.

Outro parâmetro importante fixado foi o pH do tampão de lise. Esta condição é crítica para o resultado do teste. O pH deve ser justamente 10. Diferenças consideradas insignificantes, como 0,3, já interferem na aparência das células após a eletroforese,

dificultando a avaliação das classes de dano das células e a medição do comprimento da imagem. Juntamente com o pH do tampão de eletroforese, o tempo do tratamento alcalino interfere enormemente nos resultados, pois nesse passo ocorre o desenovelamento do DNA e a expressão dos sítios alcalilábeis, que disponibilizam os fragmentos oriundos das quebras para a migração no gel de eletroforese que será visualizada como a cauda do Cometa. O pH do tampão para eletroforese recomendado pela literatura é $\text{pH} \geq 13$ (Cotelle & Ferard, 1999). O pH nos testes com planárias é igual a 12,6. Esta foi a condição estabelecida que melhor contribuiu para que o controle tivesse um índice de dano aceitável como negativo.

O nível de dano em controles negativos originários de tecidos, tanto animais quanto humanos, é geralmente alto em relação aos experimentos com sangue ou células em cultivo, devido às limitações técnicas já mencionadas. Para realizar-se testes com planárias ou outros organismos, é necessário testar sangue humano concomitantemente, para haver um controle interno das condições do teste. Assim, pode-se atribuir possíveis problemas à padronização com um tipo celular específico, tendo-se sempre o referencial de dano reconhecido em relação ao comportamento padrão das células de sangue no teste. Além do controle interno, diferenças estatisticamente significantes entre tratamento e controle permitem considerar que as alterações no DNA aumentadas verificadas possam ser consequência do efeito biológico danoso induzido pelas amostras ambientais testadas.

A avaliação dos controles negativos intra-espécies em nosso laboratório, realizada em testes diferentes, mostrou diferenças. A base da heterogeneidade é tanto biológica quanto técnica. Diferenças de sensibilidade entre os indivíduos testados, diferenças no status nutricional e variabilidade genética certamente influenciaram nas respostas. No entanto, a otimização de todos os parâmetros do teste Cometa para as planárias possibilitou um controle negativo com índices aceitáveis quando comparado ao controle negativo interno (sangue humano). Da mesma forma o controle positivo realizado através da exposição das planárias ao $\text{MMS} \times 10^{-2}$ mM mostra um resultado claramente positivo na análise do teste. As planárias paludícolas *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide são adequadas e muito sensíveis como bioindicadoras de genotoxicidade através do teste Cometa.

A reparação do DNA tem um efeito complicador sobre os resultados do teste Cometa: torna detectáveis os adutos que são induzidos pelos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes nas amostras ambientais, devido principalmente às quebras causadas no processo de excisão, mas também elimina rapidamente as lesões, limitando a persistência dos efeitos dos mutágenos (Speit & Hartmann, 1996). Por esse motivo foi realizado o teste em *G. schubarti* mixoplóide para avaliar se houve reparação dos danos. Há correlação negativa ($r = -0,886$) e significativa ($p = 0,003$) entre o tempo de reparação e o índice de dano avaliados no teste Cometa em *G. schubarti* mixoplóide. À medida que o tempo progride após a indução da

mutagenicidade, o índice de dano diminui, pois há reparação. Há diferença significativa no índice de dano ao longo do tempo avaliada pelo teste t entre amostras pareadas ($p=0,000$). Este experimento mostrou que o dano induzido no DNA pelo tratamento é reparado lentamente pelas planárias. Dois dias após a indução, o dano persiste numa taxa de cerca de 50% em relação ao momento zero, logo após a suspensão do agente mutagênico, indicando que a reparação é lenta. O resultado concorda com o obtido por Hartmann *et al.* (1995), que verificou um claro incremento na média de migração do DNA um dia após a primeira aplicação de ciclofosfamida em pacientes com câncer e persistência desse aumento até o sétimo dia depois da última exposição.

Após a padronização das condições do teste Cometa em planárias com genotóxicos de referência (Lau, 1998) foi possível avaliar amostras ambientais.

III.5. Avaliação do Potencial Genotóxico das Águas da Bacia Hidrográfica do Guaíba na Região Metropolitana de Porto Alegre – RS

As águas da bacia do Lago Guaíba são utilizadas como fonte de abastecimento para cerca de 1 milhão de habitantes (97% da população de Porto Alegre), e são uma importante via de navegação, pois liga o centro do estado ao porto de Rio Grande. São ainda utilizadas para recreação, pesca, irrigação, habitat de espécies, fonte de lazer, turismo e harmonia paisagística (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RS – Pró Guaíba, 1998).

Estão localizadas na área dessa bacia 8.236 indústrias (Pró-Guaíba/ Fepam, 1997). Muitas destas indústrias são representantes dos principais setores produtivos do Estado: siderurgia, refinaria de petróleo, indústrias de cimento, papel, celulose, petroquímica, extração carbonífera, lavouras de exportação, setor coureiro-calçadista e metal-mecânico. Esses setores são responsáveis por 86% do PIB do Rio Grande do Sul e 6,54% do PIB do Brasil. Em suas margens ainda estão presentes zonas de agricultura intensiva e regiões urbanas incluindo a região metropolitana da capital, Porto Alegre. Os diagnósticos realizados para as áreas urbanas e rurais da bacia, a partir das informações de diversas instituições estaduais e municipais, revelaram a existência de situações de poluição ambiental generalizada em todas as sub-bacias (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RS – Pró Guaíba, 1998).

Além de ações de controle de poluição ambiental, verificou-se a necessidade de recuperar, manter, e ampliar as ações de monitoramento das águas e do ar nas áreas mais comprometidas.

Foram avaliadas amostras de água de oito pontos diferentes da bacia hidrográfica do Guaíba, na região metropolitana de Porto Alegre, durante dois anos. Estes pontos são

algumas das estações de coleta usadas pelo DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgotos, para avaliar a qualidade das águas do Guaíba, pois este manancial abastece a região metropolitana de Porto Alegre. Os pontos de coleta foram selecionados por terem sido considerados como representativos na formação e composição das águas do Lago Guaíba. Os pontos selecionados foram a estação 31, foz do Rio Gravataí, definida como prioritária para o programa Pró-Guaíba, a estação 57, foz do Rio Jacuí, estação 58, foz do Rio Caí, e 59, foz do Rio dos Sinos, para uma avaliação prévia da contribuição dos afluentes para a poluição da Bacia do Guaíba (Fig. 1). Dos pontos monitorados pelo DMAE no Guaíba (Fig. 2) selecionamos a estação 38, Ponta da Cadeia, por ser um ponto de emissão subaquática de poluição urbana (Atlas Ambiental de Porto Alegre, 1998), estação 51b, que recebe efluentes da Riocell, estação 61, foz do Guaíba, próxima à saída das águas do Guaíba para a Lagoa dos Patos e a estação 40 Arroio Dilúvio que é uma área onde foi constatado um grande impacto ambiental (Atlas Ambiental de Porto Alegre, 1998).

III.5.1. Correlação do Índice de Dano (ID) entre os Grupos-Teste e Controle Negativo (C-)

O teste Cometa caracteriza-se pela heterogeneidade das respostas, dependentes de variações mínimas nas condições do teste como já discutido. Ao microscópio as imagens de forma circular demonstram que o DNA não foi lesado, e em forma de “cometa” demonstram lesão. Há vários critérios utilizados para verificar se um resultado é positivo no teste Cometa (Tice *et al.*, 2000). A análise foi feita com medidas das células através de uma lente ocular com escala (Betti *et al.*, 1994); e através da avaliação visual das classes de dano (de 0 - sem dano, à IV - dano máximo), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (Collins *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994). O índice de dano (ID) é calculado através da frequência relativa de células com as classes de dano visualizadas, multiplicada pelo valor atribuído a cada classe, de 0 a 4. Soma-se tudo e tem-se o ID da amostra e/ou controles.

As amostras de água coletadas em cada estação foram avaliadas conjuntamente, formando um grupo-teste. Por isso os controles negativos e positivos são iguais para uma determinada estação do ano. Sendo os controles iguais para todas as amostras testadas em uma estação, pode-se verificar se há influências metodológicas, inerentes à técnica do Cometa, sobre o resultado. Para isso foi feito um teste de correlação entre os controles negativos e os resultados das águas testadas.

A correlação de Pearson ($r=0,298$) entre o índice de dano e o controle negativo foi significativa para 5% no teste Cometa em *G. tigrina*. A correlação significativa revela que pequenas variações nas condições do teste Cometa influenciam o índice de dano obtido nos

testes e nos controles negativos. Para corrigir o problema adotou-se uma nova variável a partir da diferença entre o índice de dano (ID) obtido nas amostras e o controle negativo (C-) migrado em cada teste. Esta variável é identificada por ID – C- ou DELTANEG. Tal grandeza é mais autêntica e isenta de vieses técnicos, porque representa somente o índice de dano real sofrido pelas células pois o dano de fundo ou background de mutações característico das células de planárias no teste Cometa foi eliminado. Quando não há correlação, ou seja, quando as condições do teste não influenciam a resposta dos testes e dos controles, sendo os índices de dano dos testes obtidos independentemente dos índices de dano dos controles, o ID é aceitável. O ID – C- diminui a flutuação dos resultados que variam em função das diferenças mínimas nas condições de teste para teste, por isso é um parâmetro mais confiável para a análise dos resultados. Conforme a revisão de Tice *et al.* (2000) um dos problemas do teste Cometa é a variedade de métodos de análise das respostas e os muitos testes estatísticos diferentes para testá-las. No entanto, as abordagens típicas incluem um teste de correlação para avaliar a associação dose-resposta e uma comparação de amostras pareadas de cada grupo dose em relação ao controle para identificar-se efeitos significantes nas doses individuais. O método estatístico pode ser unilateral quando é testada apenas uma possibilidade, ou seja, somente o aumento ou somente o decréscimo na migração do DNA. E bilateral quando podem ocorrer ambas as situações, tanto um aumento quanto um decréscimo na migração do DNA.

III.5.2. Resultados do Teste Cometa na Avaliação do Potencial Genotóxico das Águas da Bacia Hidrográfica do Guaíba

A diferença entre o índice de dano (ID) e o controle negativo (C-) testada através do teste t foi significativa para os dados obtidos no monitoramento do manancial ($p=0,000$). A resposta positiva no teste Cometa em *G. tigrina* indica que foi detectado potencial genotóxico nas águas coletadas nos Rios Gravataí, Jacuí, Caí, Sinos, e na Ponta da Cadeia, Arroio Dilúvio, Guaíba próximo à Riocell e Gauíba próximo à Lagoa dos Patos nos anos de 2000 e 2001. A média de índice de dano menos controle negativo e de índice de dano mais baixa foi a do Rio Jacuí ($X=19,32$). No entanto, um teste t de amostras pareadas realizado entre os controles negativos e os índices de dano deste ponto também mostraram-se significantes ($p=0,003$). Portanto, até mesmo as águas do Rio Jacuí, o menos poluído dos rios formadores do Lago Guaíba, tendo induzido os menores danos no DNA das planárias *G. tigrina*, apresenta potencial genotóxico significativo.

A diferença entre os pontos de coleta foi inicialmente testada por ANOVA e não houve diferenças significativas entre o índice de dano menos controle negativo entre os pontos de coleta amostrados entre o verão de 1999/2000 e a primavera de 2001 ($p=0,361$)

analisados pelo teste Cometa em *G. tigrina*. Consideramos que nesse caso ANOVA não é um teste muito sensível em função das variâncias elevadas, fez-se a comparação entre amostras pareadas. No artigo de revisão de Tice *et al.* (2000) é descrito na avaliação e interpretação de resultados que as abordagens típicas para identificação de respostas positivas incluem um teste de correlação para avaliar a associação dose-resposta e uma comparação de amostras pareadas de cada grupo dose em relação ao controle para identificar-se efeitos significantes nas doses individuais. Portanto, para verificar se algum ponto apresentava maior genotoxicidade que outro, foram comparadas as médias dos resultados (ID – C-) das oito coletas de cada ponto e foi aplicado o teste estatístico t entre amostras pareadas, comparando-se os pontos dois a dois. Tice *et al.* (2000) dizem ainda que o método estatístico pode ser unilateral quando é testada apenas uma possibilidade, ou seja, somente o aumento ou somente o decréscimo na migração do DNA. E bilateral quando podem ocorrer ambas as situações, tanto um aumento quanto um decréscimo na migração do DNA.

No caso da comparação entre pontos de coleta foi aplicado o teste bilateral, que identificou diferenças significativas entre o Gravataí e o Jacuí ($p=0,007$), entre o Caí e o Jacuí ($p=0,019$) e entre o Caí e a Ponta da Cadeia ($p=0,041$). No entanto, segundo a nossa interpretação, como as respostas foram consideradas positivas no teste t entre dano e controle negativo, indicando que houve aumento na migração do DNA, poderia ter sido feito um teste unilateral, que evidenciaria ainda mais as diferenças entre pontos de coleta, tornando significantes tendências verificadas quanto à diferença entre Guaíba R, que recebe descarga de efluente da Riocell e o Rio Jacuí ($p=0,073$), já que no teste unilateral a significância teria sido 0,037, ou seja $p<0,05$. Neste caso, o teste unilateral seria altamente aceitável, mostrando diferença significativa no teste t entre dano e controle negativo, entre o ponto onde o efluente da Riocell é liberado e o Rio Jacuí.

A poluição generalizada detectada pelo teste Cometa em planárias em todos os pontos de coleta localizados na região metropolitana de Porto Alegre, está relacionada às atividades antrópicas sobre as águas da bacia do Guaíba. A descrição de tais atividades faz-nos inferir sobre os motivos que conduzem a uma resposta genotóxica positiva.

A diferença entre as estações nas quais foram coletadas as amostras, entre 2000 e 2001, quanto à variável ID – C- ($p=0,066$) segundo ANOVA, indica significância, tendo as amostras de inverno apresentado maior dano. Quando foi aplicado o teste de correlação de Pearson para estes mesmos dados (ver **Tabelas 26 e 27** na Discussão) a correlação foi igual a 0,05015175044537, mostrando, portanto, um forte indício de significância. Diante deste indício, deve-se aprofundar as investigações levando-se em conta a importância biológica de tal tipo de resultado. As médias dos índices de dano menos controle negativo induzidas pelas águas coletadas no verão são bastante menores do que as médias de

DELTANEG induzidas no inverno. Tal resultado nos conduz à construção de argumentos que indiquem os motivos de tal acontecimento.

O deflúvio superficial urbano contém todos os poluentes que se depositam na superfície do solo. Já o deflúvio superficial agrícola depende dos tipos de práticas agrícolas característicos de cada região, sendo aumentado nas épocas em que se usam fertilizantes e defensivos e quando ocorre erosão, em dependência do regime de chuvas (CETESB, 2001). As chuvas, mais intensas no inverno, lavam as margens e arrastam materiais depositados em valas e bueiros, juntamente com substâncias genotóxicas para dentro do manancial. Essa condição, aliada a baixa temperatura que mantém as substâncias estáveis, ou seja, elas não volatilizam, contribui para um maior potencial genotóxico no inverno do que no verão. Vargas e colaboradores (1993) verificaram variações sazonais significativas no potencial genotóxico das amostras de águas do Rio Caí na bacia do Guaíba através do teste de Ames; e da Silva *et al* (2001) verificaram que o dano genético induzido no inverno em roedores fossoriais expostos ao carvão é maior do que o dano induzido no verão, em avaliação realizada através do teste Cometa. Voltando aos nossos resultados, a variação no regime de chuvas comparado entre os invernos de 2000 e 2001, também é um parâmetro importante a ser considerado. O índice pluviométrico total do período de coleta considerado Inverno 2000 foi muito maior (93,9 mm), do que no Inverno 2001 (4,6 mm), indicando a possibilidade de uso de outro parâmetro, como a vazão do manancial, na tentativa de entender o motivo do aumento do potencial genotóxico. Tais comparações incentivam-nos a realizar novos testes, incluímos o parâmetro vazão do manancial, e ampliarmos a amostra para obtermos resultados mais fidedignos e conclusivos quanto aos motivos de maior potencial genotóxico no inverno em relação ao verão, e variação intra-sazonal do potencial genotóxico de um ano para o outro.

Como já discutido anteriormente, o índice de dano também é uma variável usada na identificação de respostas no teste Cometa (Tice *et al.*, 2000). Quando foi usada a variável índice de dano para avaliar a diferença entre as estações do ano, o resultado foi significativo ($p=0,009$) segundo ANOVA. Este dado relaciona-se à diferença discutível obtida entre o verão ($X=48,96$) e o inverno ($X=58,21$) nos dados referentes a todas as espécies, *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide, tomadas em conjunto (**Tabela 19**). O resultado significativo para as diferenças entre verão e inverno foi confirmado pela correlação significativa obtida entre *G. tigrina* e estações do ano na correlação de Pearson ($r=0,672$; $p=0,033$; ver **Tabela 26** na Discussão).

III.5.3. Correlação entre os Resultados do Teste Cometa e Parâmetros Físico-Químicos Coletados pelo DMAE

As diferentes formas de aporte para os mananciais tornam, na prática, inexecutável a análise sistemática de todos os poluentes que possam estar presentes nas águas superficiais. Por isso o Departamento Municipal de Águas e Esgotos de Porto Alegre faz uso de indicadores de qualidade de água que foram usados neste trabalho. O entendimento de como os parâmetros físico-químicos interagem entre si, exercendo um efeito sinérgico sobre a variável biológica de interesse, dano menos controle negativo, necessitaria de novos desenhos experimentais de natureza interdisciplinar. No intuito de iniciar um trabalho estatístico que contribua no entendimento das relações intrincadas entre a variável biológica e os parâmetros físico-químicos disponibilizados pelo DMAE, verificou-se correlação significativa entre DELTANEG e resíduo total 105°C ($r=0,278$), resíduo total fixo a 550°C ($r=0,254$), condutividade ($r=0,267$), cloreto ($r=0,300$), nitrogênio orgânico ($r=0,340$) e flagelados pigmentados ($r=0,293$) (ver **Tabela 15** nos Resultados).

Nos estudos de controle de poluição das águas naturais, principalmente na caracterização de esgotos sanitários e de efluentes industriais, as determinações dos níveis de concentração das diversas frações de sólidos resultam em um quadro geral da distribuição das partículas com relação ao tamanho (sólidos em suspensão e dissolvidos) e com relação à natureza (fixos ou minerais e voláteis ou orgânicos). Este quadro não é definitivo para se entender o comportamento da água em questão, mas constitui-se em uma informação preliminar importante (CETESB, 2001).

Os resíduos representam sólidos orgânicos e inorgânicos presentes no manancial que podem causar danos aos peixes e à vida aquática. Eles podem se sedimentar no leito dos rios prejudicando a biota que fornece alimentação, ou também danificar os leitos de desova de peixes. Os sólidos podem reter bactérias e resíduos orgânicos no fundo dos rios, promovendo decomposição anaeróbia. Altos teores de sais minerais, particularmente sulfato e cloreto, estão associados à tendência de corrosão em sistemas de distribuição e conferem sabor desagradável à água (CETESB, 2001).

A condutividade está diretamente relacionada com a concentração de íons em solução, resultantes da dissociação de sais minerais na coluna d'água. A condutância específica fornece uma boa indicação das modificações na composição da água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece nenhuma indicação das quantidades relativas dos vários componentes. À medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados, a condutividade específica da água aumenta (CETESB, 2001).

Juntos, os parâmetros de resíduos, condutividade e cloretos, que apresentaram correlação significativa com DELTANEG, afetam a biodisponibilidade de mutagênicos aos organismos aquáticos, e podem indicar características corrosivas da água, podendo desempenhar papel importante para o potencial genotóxico detectado através do teste Cometa em planárias expostas às águas do Lago Guaíba.

O nitrogênio orgânico faz parte de uma série na qual se incluem ainda a amônia, o nitrito e o nitrato. As duas primeiras formas são formas reduzidas e as duas últimas são oxidadas (CETESB, 2001).

O entendimento do metabolismo geral dos ecossistemas depende da produção biológica e consumo de matéria orgânica, e da ciclagem de nutrientes, que informa como ocorrem as trocas entre as porções biótica e abiótica do sistema. O nitrogênio é um dos macronutrientes mais importantes nos ecossistemas aquáticos, juntamente com o carbono e o fósforo (Pinto-Coelho, 2000). Por tais motivos, a série de nitrogênio usualmente monitorada nos mananciais de água-doce, também apresentou correlação significativa com DELTANEG.

O nitrogênio é estocado nos ecossistemas na matéria orgânica, viva e morta, formando a maior parte da biomassa dos animais, algas e plantas. É essencial para os processos biológicos que formam aminoácidos que compõem as proteínas e para as bases nitrogenadas que formam o DNA e o RNA. Nas bactérias fotossintetizantes, algas e plantas, o nitrogênio é usado nas moléculas de clorofila da qual depende a fotossíntese. Fazendo parte da matéria orgânica é re-convertido em suas formas inorgânicas na atmosfera que é o reservatório abiótico de nitrogênio (78%), quando reinicia o seu ciclo biogeoquímico (Smil, 2002). Em águas interiores, o fósforo e o nitrogênio são normalmente os fatores limitantes da produção primária (Pinto-Coelho, 2000). Quando o nitrogênio é descarregado nas águas naturais conjuntamente com o fósforo e outros nutrientes presentes nos despejos, provoca o enriquecimento do meio tornando-o mais fértil e possibilitam o crescimento dos seres vivos que os utilizam, o que é chamado de eutrofização. Quando as descargas de nutrientes são muito fortes, dá-se o florescimento muito intenso de gêneros que predominam em cada situação em particular. Estas grandes concentrações de algas podem trazer prejuízos aos usos que se possam fazer dessas águas, prejudicando seriamente o abastecimento público ou causando poluição por morte e decomposição (CETESB, 2001). Portanto, os flagelados pigmentados se correlacionam com o índice de dano menos controle negativo por serem organismos adaptáveis a condições variáveis no ambiente, podendo realizar fotossíntese ou não, em dependência de fatores como dióxido de carbono, nitrogênio orgânico, e fósforo, os principais macronutrientes nos ecossistemas aquáticos (Pinto-Coelho, 2000).

As ações humanas têm contribuído significativamente para a transferência de gases de nitrogênio da Terra para a atmosfera, e dos ecossistemas terrestres para os aquáticos, efetivamente duplicando tais transferências nos últimos cem anos devido a produção industrial de fertilizantes, queima de combustíveis fósseis, cultivo de grãos que favorecem relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e acelerando a liberação do nitrogênio estocado nos solos e na matéria orgânica (Vitousek *et al.*, 1997; Smil, 2002). O Nitrogênio reativo inclui todos os compostos do nitrogênio presentes na atmosfera e na biosfera que são radiativos, biologicamente ativos e reativos fotoquimicamente. Assim, o N reativo inclui formas inorgânicas reduzidas como NH_3 e NH_4^+ , inorgânicas oxidadas NO_x , HNO_3 , N_2O , NO_3^- , e compostos orgânicos como uréia, aminas e proteínas, em contraste com o gás N_2 , não-reativo (Vitousek *et al.*, 1997).

A alteração do ciclo do nitrogênio e suas expressões como radicais livres são quimicamente instáveis e extraordinariamente reativos em combinações inespecíficas com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular dos organismos e derivados de cada uma delas. Os radicais livres são formados por absorção de radiação, por reações redox ou por processos de catálise enzimática. Os radicais livres do nitrogênio são grandemente responsáveis por danos oxidativos. As espécies reativas do nitrogênio podem modificar muitas macromoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, sendo apenas sobrepujadas em produção e efeitos pelos radicais livres do oxigênio (Moncada *et al.*, 1991).

O metabolismo dos compostos nitrogenados nos ecossistemas tem implicações ecológicas e bioenergéticas fundamentais nas cadeias tróficas, afetando, portanto, também a produção secundária. O controle e o monitoramento de poluição ou o estabelecimento de técnicas de manejo sustentado de ecossistemas são exemplos práticos do uso aplicado do estudo quantitativo dos ciclos biogeoquímicos (Pinto-Coelho, 2000). Há relação entre as formas de nitrogênio presentes em amostra de águas e o foco da poluição. Se prevalecerem as formas reduzidas (nitrogênio orgânico e amoniacal), o foco de poluição se encontra próximo; se predominarem as formas oxidadas (nitrito e nitrato) as descargas de esgotos se encontram distantes.

A ação antrópica interfere na quantidade de nitrogênio dos mananciais de água doce. A atmosfera constitui fonte importante de nitrogênio nas águas devido a diversos mecanismos: a fixação biológica é realizada por bactérias e algas, que incorporam o nitrogênio atmosférico em seus tecidos, contribuindo para a presença de nitrogênio orgânico nas águas; a fixação química, reação que depende da presença de luz, concorre para as presenças de amônia e nitratos nas águas; as lavagens da atmosfera poluída pelas águas pluviais concorrem para as presenças de partículas contendo nitrogênio orgânico bem como para a dissolução de amônia e nitratos (CETESB, 2001).

Os esgotos sanitários constituem em geral a principal fonte de nitrogênio orgânico lançado nas águas devido à presença de proteínas e nitrogênio amoniacal, através da hidrólise sofrida pela uréia na água. Indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, de conservas alimentícias, matadouros, frigoríficos e curtumes lançam efluentes que também concorrem para as descargas de nitrogênio orgânico e amoniacal nas águas. Nas áreas agrícolas, o escoamento das águas pluviais pelos solos fertilizados também contribui para a presença de diversas formas de nitrogênio. Nas áreas urbanas, as drenagens de águas pluviais associadas às deficiências do sistema de limpeza pública, constituem fonte difusa de difícil caracterização. A resolução do CONAMA 20/86 utiliza o nitrogênio amoniacal como padrão de classificação para controle da qualidade das águas naturais e padrão de emissão de esgotos. A amônia é tóxica para os peixes e quando oxidada aumenta o consumo de oxigênio dissolvido nas águas. Os nitratos são tóxicos, causando uma doença chamada metahemoglobinemia infantil, que é letal para crianças. O nitrato se reduz a nitrito na corrente sanguínea, competindo com o oxigênio livre, tornando o sangue azul (CETESB, 2001).

A intrincada e complicada inter-relação entre os indicadores da qualidade das águas pode ser analisada de uma maneira simplificada, usando-se a ferramenta estatística de análise de componentes principais (Teixeira *et al.*, 2000). Este instrumento agrupa os diferentes parâmetros coletados em novas variáveis ou fatores, que são combinações lineares das originais, com preservação de 83,3% dos dados originais. Estes fatores reduzidos podem então ser usados para plotar gráficos, onde pode-se ter uma estimativa visual de como eles determinam e evidenciam a distribuição dos resultados dos parâmetros já testados: diferença entre pontos de coleta e estações do ano (ver **Gráficos 6, 7 e 8** nos Resultados). Os seguintes componentes apresentaram correlação significativa com DELTANEG: componente Físico e Químico (composto pelas variáveis iniciais cloreto, resíduo fixo, condutividade e resíduo total); Temperatura (do ar e da água); e Biomassa (nitrato e número total de plâncton).

A correlação dos resultados do teste Cometa em planárias com o fator denominado Físico e Químico pode ser explicada pela associação dos resíduos, que disponibilizam as mais variadas substâncias para o ambiente aquático, ao aumento da condutividade, que representa o teor de sais e esta, conseqüentemente, ligada aos cloretos. Os esgotos sanitários são fontes importantes de descargas de cloretos nas águas superficiais, sendo que cada pessoa expele através da urina cerca 6 g de cloreto por dia, o que faz com que os esgotos apresentem altas concentrações de cloreto. O cloreto apresenta também influência nas características dos ecossistemas aquáticos naturais, por provocarem alterações na pressão osmótica em células de microrganismos. Diversos são os efluentes industriais que

apresentam concentrações de cloreto elevadas como algumas indústrias farmacêuticas, curtumes, etc. As substâncias relacionadas ao cloro incluem compostos sabidamente mutagênicos e carcinogênicos.

O fator Temperatura correlaciona-se aos dados biológicos positivos obtidos, pois as variações de temperatura são parte do regime climático normal e corpos de água naturais apresentam variações sazonais e diurnas, bem como estratificação vertical. A temperatura desempenha um papel principal de controle no meio aquático, condicionando as influências de uma série de variáveis físico-químicas. Em geral, à medida que a temperatura aumenta, a viscosidade, tensão superficial, compressibilidade, calor específico, constante de ionização e calor latente de vaporização diminuem, enquanto a condutividade térmica e a pressão de vapor aumentam (CETESB, 2001), afetando a biodisponibilidade de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos. Portanto têm-se mais um indício de que variações sazonais influenciam no potencial genotóxico das amostras de águas da bacia do Guaíba.

Por fim, o fator Biomassa correlaciona-se com DELTANEG porque a alta taxa de nitrogênio aumenta a quantidade de plâncton presente no ambiente. O nitrato é usado como padrão de potabilidade, sendo 10 mg/L o valor máximo permitido pela Portaria 1469, enquanto o esgoto sanitário de uma residência típica libera de 20 a 85 mg/L/dia. Os processos de tratamento de efluentes utilizados atualmente no Brasil não são otimizados para remoção de nutrientes e por isso também contribuem para a eutrofização dos mananciais (CETESB, 2001).

III.6. Comparação da Sensibilidade entre *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* Mixoplóide

Tendo acumulado vários resultados positivos em testes de genotoxicidade, o nosso grupo de pesquisa está iniciando uma investigação acerca da comparação entre as sensibilidades das planárias usadas em tais testes. Para verificar se as diferentes espécies de planárias nativas do Rio Grande do Sul apresentam sensibilidades similares ou diferentes entre elas, foram testadas em três grupos: *G. tigrina*, *G. schubarti* (2n) e *G. schubarti* mixoplóide (2n/3n) (Lau, 1998; Guecheva, 2001; Jaeger, 2001, dados não publicados). Estas comparações foram feitas em duas coletas, verão 2000/2001 e inverno 2001.

Não há diferenças significativas entre as planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide segundo ANOVA ($p=0.757$). A diferença foi também testada por amostras pareadas (ver **Tabela 18** nos Resultados) não revelando diferenças entre as sensibilidades das espécies no teste Cometa.

Nós concluímos que o teste Cometa é uma técnica sensível e econômica para detecção de quebras no DNA, adaptada como um biomarcador não específico de genotoxicidade em planárias de água doce *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide. É interessante notar que o grupo mixoplóide, que se reproduz apenas assexuadamente, apresentou resposta similar às espécies sexuadas.

É interessante notar que, apesar do teste Cometa estar sendo aplicado em vários organismos e tecidos (Belpaeme *et al.*, 1998; Cotelle & Ferard, 1999), há referência onde a resposta do teste Cometa foi negativa no peixe *Pholis gunnellus*, em contrapartida à resposta positiva obtida na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares neste mesmo organismo (Bombail *et al.*, 2001). A conclusão do autor foi de que o teste Cometa não é adequado para biomonitoramento em peixes. Além da generalização que os dados obtidos pelo autor não podem embasar, esta comparação entre o teste Cometa e testes de mutações cromossômicas não é conclusiva. A natureza dos testes é diversa: são testes adequados a abordagens diferentes e cujos resultados devem ser interpretados com cuidado. A frequência de micronúcleos se refere a mutações cromossômicas, que são classificadas como mutações persistentes e danos cromossômicos que tendem a ser eliminados a longo prazo (Ramalho *et al.*, 1995). É como comparar-se o teste Cometa com o teste de Ames (ver Discussão). O teste Cometa ainda não foi validado para biomonitoramento. A maioria dos autores recomenda o uso de outros testes concomitantemente com o Cometa. Conforme Mitchelmore e Chipman (1998) o teste Cometa é uma técnica sensível, rápida e econômica para detecção de quebras no DNA, adaptada como um biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes e outras espécies aquáticas. Tem sido usada com sucesso para refletir uma gama ampla de exposições *in vivo* em uma grande variedade de espécies. Existe potencial para explorar o teste para obter-se informações mais detalhadas sobre efeitos em células específicas, variabilidade interindividual, e sobre a persistência de lesões que possam ser expressadas como SBs sob condições alcalinas. No entanto, enfatiza-se a necessidade de combinar essa maneira de abordagem com o uso de outros biomarcadores de exposição e de efeito e a necessidade de investigar a natureza dos danos específicos mostrados por exposições a campo que revelaram respostas positivas (Mitchelmore & Chipman, 1998).

A partir dos nossos resultados podemos afirmar que as planárias *G. tigrina*, *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide revelaram-se organismos adequados e sensíveis para detecção da genotoxicidade das águas da bacia hidrográfica do Guaíba na região metropolitana de Porto Alegre – RS e podem ser usadas para avaliar o potencial genotóxico de ecossistemas aquáticos. Esse resultado concorda com o obtido por Guecheva *et al.* (2001), única publicação referente a teste Cometa em planárias disponível na bibliografia,

que descreve os experimentos desenvolvidos pelo nosso grupo de trabalho no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

III.7. Comparação entre os Resultados do Teste Cometa e de Ames

Os resultados do teste de Ames foram obtidos pela Msc. Izabel Vianna Villela do laboratório de prestação de serviço GENOTOX da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tais dados foram gentilmente cedidos pela autora e orientador para comparação com os resultados no presente trabalho. A partir de tais comparações, está sendo preparado um artigo em revista internacional a ser submetido em março de 2003. Como os dados não foram obtidos em nosso laboratório, limitamos a apresentação dos resultados à discussão.

Um dos objetivos deste trabalho foi a comparação dos dados obtidos no teste Cometa em planárias com os obtidos no teste de reversão gênica em *S. typhimurium* linhagens TA100 e TA98 para cinco pontos e duas estações do ano na bacia do Guaíba. Foram comparados os dados obtidos no verão 1999/2000 e inverno 2000 para os pontos de coleta em comum que são os rios Gravataí, Caí e Sinos, a Ponta da Cadeia e a saída do Arroio Dilúvio no Guaíba.

As coletas de amostras não foram realizadas nas mesmas datas, pois trataram-se de experimentos independentes apesar do artigo em colaboração. As datas de coleta das amostras *in loco* para o teste Cometa em planária foram de 26/01 a 17/02 (verão 1999/2000) e 10/08 a 30/08 (inverno 2000). As datas de coleta das amostras para o teste de Ames foram 28/3 a 29/3 e 26/09 a 27/09. Essas datas ultrapassam em alguns dias o término do verão e o final do inverno. No entanto, a autora sugeriu que as coletas fossem consideradas como de verão e inverno porque as condições climáticas continuavam típicas dessas estações.

Para análise estatística de significância de resposta de uma amostra testada por Ames é usado o programa estatístico Salmonel, desenvolvido especificamente para análise estatística do teste *Salmonella*/Microsoma, o qual inclui análise de variância (ANOVA) e regressão linear. O programa foi elaborado pelo Dr. Myers (Vargas *et al.*, 2001).

Os resultados foram expressos através do índice de mutagenicidade (IM), que é a razão entre a média de revertentes na placa-teste (revertentes induzidos + revertentes espontâneos) e a média de revertentes na placa-controle negativo (revertentes espontâneos). São utilizadas as médias porque sempre são realizados três testes por dose. Utilizando estes parâmetros considera-se:

Resultado negativo: ocorre quando o número revertentes/placa do ensaio é similar ao número de revertentes/placa espontâneos.

Resultado positivo: deve cumprir três requisitos básicos: Índice Mutagênico ≥ 2 , curva dose-resposta significativa (valor de $p \geq 0,05$) e diferença entre as médias dos revertentes/placa nas diferentes doses é significativa segundo ANOVA.

Indício de mutagenicidade: no caso de um dos requisitos exigidos pelo programa para uma resposta positiva não ser significativo.

Resultado tóxico: quando índice mutagênico é inferior a 0,6, ou seja, quando o número de revertentes por placa do teste é menor do que o número de revertentes espontâneos do controle negativo (Vargas *et al.*, 1992 e 1995; Vilella, 2001), devido à morte ou deficiência no crescimento das colônias por citotoxicidade.

Para a comparação foi usada a média do índice mutagênico (IM) das três repetições do teste de Ames com as linhagens TA100 e TA98, com e sem metabolização (ver Material e Métodos). Foram usadas para a média os resultados das três réplicas da maior concentração de bactérias por placa, ou seja, 2000 $\mu\text{L/p}$. Tais dados foram comparados ao índice de dano (DANO) e índice de dano menos controle negativo (DELTANEG) obtidos nos testes com a espécie *G. tigrina* no verão 1999/2000 e inverno 2000.

Não foi possível comparar os resultados de *G. schubarti* e *G. schubarti* mixoplóide com os resultados do teste de Ames porque as coletas de amostras no teste com planárias foram realizadas no ano 2001, enquanto as amostras para o teste de Ames foram coletadas em 2000.

Para as comparações foi usado o teste de correlação de Pearson que se destina especificamente a medir o grau de relação entre duas variáveis (revisão em Silva, 1999). Como foram muitas variáveis a serem comparadas, os resultados estão apresentados em matrizes de correlação geradas pelo programa estatístico SPSS for Windows versão 9.0.0 de dezembro de 1998.

Antes de comparar os resultados obtidos no teste de Ames com os obtidos no teste Cometa é necessário esclarecer que eles têm naturezas distintas. O Cometa é um teste de genotoxicidade ou indicativo de mutagenicidade, enquanto Ames é um teste de avaliação de mutação gênica.

Os danos avaliados em testes de genotoxicidade como o teste Cometa são lesões primárias no DNA, passíveis de reparação. Já a linhagem TA100 usada no teste de Ames detecta mutagênicos que causam substituição de pares de base do DNA, através de uma mutação no gene *his_{G46}* que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Tem como ponto preferencial para a reversão o par GC, sendo substituída uma prolina por uma leucina. Já a linhagem TA98 detecta mutagênicos que causam defasagem no quadro de

leitura do DNA (*frameshift mutation*), apresentando como ponto preferencial de lesão oito resíduos repetitivos GC no *operon* do gene *his_{d3052}*, que codifica para a enzima histidinol desidrogenase (Barnes *et al.*, 1982; Levin *et al.*, 1982; Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000).

As quebras de DNA (*Strand Breaks* ou SBs) detectadas no teste Cometa são devidas tanto a efeitos diretos de substâncias xenobióticas, quanto refletem o dano que pode ocorrer no estado redox normal da célula, como demonstrado por Hartmann & Speit (1997). O teste Cometa, portanto, é sensível na detecção de lesões inespecíficas, diferente das lesões específicas detectadas pelo teste de Ames.

As lesões genotóxicas inespecíficas detectadas pelo teste Cometa podem sofrer reparação e não serão necessariamente herdáveis ou evoluirão em mutações, enquanto as mutações gênicas detectadas pelo teste de Ames podem ser transmitidas às gerações bacterianas subsequentes.

Os primeiros resultados da comparação foram gerados a partir da correlação dos dados obtidos no teste de Ames com a linhagem TA100 com os resultados obtidos no teste Cometa nas planárias *G. tigrina*. Foram correlacionados o índice mutagênico (IM) de TA100 com (TA100 S9) e sem fração S9 (TA100), o índice de dano (DANO) e dano menos controle negativo (DELTANEG), as estações do ano e os pontos de coleta. A matriz de correlações é apresentada abaixo.

Tabela 26. Estatística descritiva e matriz de correlação entre os resultados obtidos no teste de Ames com a linhagem TA100 e os obtidos em *G. tigrina* nas estações verão e inverno de 2000.

Estatística Descritiva			
	Média	Desvio Padrão	N
DELTANEG	31,20	22,34	10
DANO	51,70	23,37	10
TA100 SEM S9	,97	,18	10
TA100 COM S9	1,04	,38	10
ESTAÇÃO DO ANO	2,00	1,05	10

Correlações						
		DELTANEG	DANO	TA100 SEM S9	TA100 COM S9	ESTAÇÃO DO ANO
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	,999**	,043	,463	,632*
	Sig. (bilateral)	,	,000	,907	,178	,050
	N	10	10	10	10	10
DANO	Correlação de Pearson	,999**	1,000	,037	,480	,672*
	Sig. (bilateral)	,000	,	,919	,160	,033
	N	10	10	10	10	10
TA100 SEM S9	Correlação de Pearson	,043	,037	1,000	-,184	-,053
	Sig. (bilateral)	,907	,919	,	,611	,885
	N	10	10	10	10	10
TA100 COM S9	Correlação de Pearson	,463	,480	-,184	1,000	,555
	Sig. (bilateral)	,178	,160	,611	,	,096
	N	10	10	10	10	10
ESTAÇÃO DO ANO	Correlação de Pearson	,632*	,672*	-,053	,555	1,000
	Sig. (bilateral)	,050	,033	,885	,096	,
	N	10	10	10	10	10

** - Correlação é significativa para 0,01 (bilateral).

* - Correlação é significativa para 0,05 (bilateral).

As correlações obtidas foram apenas entre os resultados de dano genético no teste Cometa e as variáveis sazonais, já descritas. Não há correlações entre os resultados dos testes de Ames na linhagem TA100 e os dados obtidos através do teste Cometa em *G. tigrina* empregados para avaliação do risco genotóxico oferecido pelas águas do Guaíba.

A próxima comparação é entre os dados obtidos no monitoramento com *G. tigrina* e os resultados do monitoramento das águas através do teste de Ames com a linhagem TA98.

Tabela 27. Estatística descritiva e matriz de correlação entre os resultados obtidos no teste de Ames com a linhagem TA98 e os obtidos em *G. tigrina* nas estações verão e inverno de 2000.

Estatística Descritiva			
	Média	Desvio Padrão	N
DELTANEG	31,20	22,34	10
DANO	51,70	23,37	10
TA98 SEM S9	,87	,32	10
TA98 COM S9	1,08	,27	10
ESTAÇÃO DO ANO	2,00	1,05	10

Correlações						
		DELTANEG	DANO	TA98 SEM S9	TA98 COM S9	ESTAÇÃO DO ANO
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	,999**	-,072	-,283	,632*
	Sig. (2-tailed)	,	,000	,843	,428	,050
	N	10	10	10	10	10
DANO	Correlação de Pearson	,999**	1,000	-,092	-,277	,672*
	Sig. (2-tailed)	,000	,	,801	,438	,033
	N	10	10	10	10	10
TA98 SEM S9	Correlação de Pearson	-,072	-,092	1,000	,260	-,336
	Sig. (2-tailed)	,843	,801	,	,468	,343
	N	10	10	10	10	10
TA98 COM S9	Correlação de Pearson	-,283	-,277	,260	1,000	-,092
	Sig. (2-tailed)	,428	,438	,468	,	,800
	N	10	10	10	10	10
ESTAÇÃO DO ANO	Correlação de Pearson	,632*	,672*	-,336	-,092	1,000
	Sig. (2-tailed)	,050	,033	,343	,800	,
	N	10	10	10	10	10

** · Correlação é significativa para 0,01 (bilateral).

* · Correlação é significativa para 0,05 (bilateral).

Novamente não houve correlação entre as respostas do teste de Ames com TA98 e os resultados do teste Cometa *G. tigrina* na avaliação da qualidade das amostras de águas da bacia hidrográfica do Guaíba no verão e inverno de 2000.

Como há a defasagem de um mês entre as amostragens de águas do Guaíba para o teste de Ames e para o teste Cometa, é possível que a variação das condições das amostras

colabore para as correlações não-significantes resultantes das comparações estatísticas. Como viu-se que as condições climáticas estão associadas ao dano e índice de dano menos controle negativo induzidos, é possível que esta defasagem possa ter colaborado na não-correlação. O ideal teria sido a comparação das mesmas amostras nos testes diferentes (Ames e Cometa).

Um resultado interessante encontrado na literatura relacionado à comparação entre o teste Cometa e um teste de indução de mutações gênicas foi a exposição de fêmeas de camundongos ao ozônio durante 90 min. Dentro dos primeiros 200 min após a exposição, as células alveolares dos camundongos expostos a 1 ou 2 ppm de O₃ mostraram um aumento de 1,6 e 2,6 vezes no comprimento da cauda avaliadas pelo teste Cometa, em relação às fêmeas não tratadas. Foi sugerida a explicação de que esse efeito durante os primeiros 200 min fosse devido a uma maior infiltração de linfócitos ou neutrófilos, já que não houve efeito após 200 min. Houve também uma grande indução de interleucina-6 no pulmão depois que SBs foram induzidas nas células bronquioalveolares. Para determinar quais destas exposições foram mutagênicas, os animais foram expostos a 2ppm O₃, 90 min por dia durante 5 dias e não foram detectadas mutações no transgene *cII*. Esse resultado indicou que um curto episódio de exposição ao O₃ numa concentração 5x além do limite estabelecido induz mediadores inflamatórios e dano no DNA nas células do lúmen do pulmão. Esse efeito positivo, no entanto, não foi acompanhado por uma indução de mutações no pulmão dos camundongos testados (Bornholdt *et al.* 2002).

A análise do potencial genotóxico das águas é influenciada e complicada por tantas variáveis e sinergismos que a avaliação do risco deve ser múltipla. Testes devem ser selecionados pela sua sensibilidade na detecção da mutagenicidade e/ou carcinogenicidade potenciais e pela sua adequação aos tipos de amostras a serem testadas, de modo a prever e medir um possível impacto ambiental. Uma bateria de testes deve incluir tanta diversificação quanto possível: organismos-teste variando de fagos, bactérias, fungos, *Drosophila*, planárias, plantas a mamíferos íntegros ou apenas células destes (Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines, 1993; Auletta *et al.*, 1993). O diagnóstico deve ser múltiplo para que as ações de reversão dos quadros críticos de ambientes impactados também sejam multiplicadas.

Como conclusão, pode-se dizer que o Cometa é um teste muito sensível, indicativo de risco potencial de genotoxicidade, não é um teste de mutagenicidade.

III.8. Testes-piloto para a Padronização do Monitoramento do Ar *in Loco* Através do Teste *Tra-SHM*

A poluição do ar afeta as plantas de vários modos. Um dano agudo ocorre após absorção de quantidade suficientes de gás ou outras formas de tóxicos que destroem os tecidos e conferem às folhas uma aparência úmida. Subseqüentemente elas secam e desbotam, ou então se tornam marrons ou marrom avermelhadas. O dano crônico, por outro lado, resulta da absorção de poluentes gasosos ou sob outras formas, que são insuficientes para causar danos agudos, ou isso pode ser causado por exposição a doses subletais de tóxicos durante um longo período de tempo. A injúria crônica é manifestada por folhas amareladas que vão desbotando progressivamente até que toda a clorofila e carotenóides sejam destruídos. A epiderme é o primeiro alvo do poluente aéreo que passa através dos estômatos e se dissolve na superfície das células das folhas afetando o pH celular. O poluente é convertido em uma forma que é mais tóxica e mais reativa do que a substância tóxica original, formando radicais livres que iniciam reações nas células. O poluente afeta o metabolismo celular levando a injúria da planta. Contaminantes comumente presentes no ar, como o dióxido de enxofre, causam mudanças na ultraestrutura de várias organelas, como os cloroplastos ou mitocôndrias, podendo perturbar a fotossíntese ou metabolismo energético das células da planta (Yu, 2001). O teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* 4430 serve para avaliar danos resultantes de exposições agudas ou crônicas. *Tradescantia* é um sistema validado para biomonitoramento desde 1991 (Ma, 2001).

Foram realizados testes piloto para a padronização do monitoramento do ar *in loco* através do teste de mutação gênica em pêlos estaminais de *Tradescantia* (TRA-SHM). Como resultados nos testes preliminares obtivemos:

1. Controle negativo histórico do estoque de *Tradescantia* clone 4430 é de $0,58/1000 \cong 6 \times 10^{-4}$. Este valor reflete o nível basal de mutações da espécie. É usado como referência negativa para o resultado dos testes em amostras ambientais;
2. Determinação do número médio de pêlos estaminais da população estoque = 247. A contagem de eventos mutacionais em testes poderia ser baseada nesse número médio total de pêlos estaminais (247), no entanto, há recomendação de contagem de eventos e pêlos estaminais em apenas 3 flores por teste, extrapolando-se este resultado para 7 flores, ao invés de usar-se este número médio de pêlos. Esta recomendação deverá ser seguida, pois o número médio de pêlos estaminais altera-

se com a exposição e, portanto, deve ser aferido em cada teste (Ma, Saldiva e Rodrigues, 1998).

3. Teste para avaliação do pico de mutações em pêlo estaminal após 7º, 8º, 9º e 10º dias de recuperação após exposição das inflorescências no ponto localizado na confluência da Av. Ipiranga com Silva Só. Este ponto foi considerado importante para o monitoramento porque há um grande trânsito de veículos por minuto neste local na cidade de Porto Alegre, principalmente no início da manhã e à tardinha. A exposição iniciou às 18 horas e terminou às 8:00 h da manhã do dia seguinte, totalizando 14 horas (ver Material e Métodos). Os resultados mostraram que não há diferenças significativas entre o sétimo e o décimo dia de recuperação, por terem sido detectados índices similares de mutações por mil pêlos. Portanto o pico máximo não foi fixado, pois são necessários mais testes piloto para obter o dia de recuperação onde temos o maior número de mutações, e pode ser que não haja diferenças significativas no número de eventos contados nos dias de recuperação. Mais experimentos serão realizados quando a produção de inflorescências for suficiente.

As condições de cultivo ainda precisam ser otimizadas para aumentar-se o número de plantas e, portanto, de inflorescências, para realização de testes. Para cada ponto de monitoramento do ar são necessárias cerca de 25 inflorescências, para garantir-se o número de 7 flores abertas no tempo de recuperação. O tempo de recuperação ainda deverá ser avaliado como o mais adequado para a contagem dos eventos mutacionais. Este parâmetro deve ser fixado ao longo de vários experimentos, o que exige uma produção elevada de inflorescências, ou seja, um aumento na amostragem.

Há dados na literatura que dizem que *Tradescantia* 4430 cresce profusamente, e que assim, uma grande população de plantas maduras pode ser propagada em 40 a 60 dias (Ma, 1982). É necessária uma população de cerca de 500 vasos para obter-se no mínimo 200 cortes de plantas em excelentes condições para teste, a cada duas semanas. O Dr. Ma, que acumula o maior número de publicações com *Tradescantia*, em comunicação recente conosco, disse que há problemas na adaptação de *Tradescantia* clone 4430 a certas condições climáticas. Até o presente momento 20 países cultivam *Tradescantia* para biomonitoramento, com testes de aberrações cromossômicas, micronúcleos e pêlos estaminais, mas alguns têm tido problemas no cultivo. Apesar dos testes terem sido estandarizados com o *Tradescantia* 4430 este clone não é bem adaptado ao clima tropical, mostrando problemas no crescimento e produção de flores. Também é atacado por parasitas e insetos, fato que limita seu uso no biomonitoramento da poluição do ar (Suyama *et al.*,

2002). No México o Dr. Cabrera levou cerca de quatro anos para ter um número de vasos suficientes para testes devido ao clima (Ma, 2001; Com. pessoal).

Como resultado de uma exposição única de *Tradescantia* 4430 no ponto localizado na Av. Silva Só com a Av. Ipiranga em Porto Alegre, verificou-se a média de indução de 4,5 mutações por mil pêlos estaminais ($4,5 \times 10^{-3} = 10:2.233$) em relação ao controle histórico negativo ($0,58 \times 10^{-3} \cong 6:10.000$), indicando o potencial genotóxico do ar neste local ($\chi^2 = 4,09$; $p < 0,05$).

Nós pretendemos implantar o teste de mutações gênicas em pêlos estaminais de *Tradescantia* como rotina no monitoramento da qualidade do ar em Porto Alegre, mas dependemos de um Fitotron, ou de uma casa de vegetação em condições para evitar as grandes variações de temperatura características do clima sub-tropical úmido de Porto Alegre. Outra alternativa seria utilizar *T. pallida* em testes de micronúcleos, no entanto, esta não possui marcadores específicos para mutação gênica. Em São Paulo *Tradescantia pallida* (Rose) var. *purpurea* foi testada quanto à sensibilidade à radiação X. Esta espécie é amplamente distribuída como planta ornamental em jardins e ao longo de ruas e estradas, devido à sua grande resistência e fácil propagação. As curvas dose-resposta obtidas na frequência de micronúcleos obtidos induzidos por radiação X foram semelhantes para *T. pallida* e clone 4430. Estes resultados confirmam a sugestão de que *T. pallida* representa uma boa alternativa para testes de mutagenicidade *in situ*, especialmente estudos de biomonitoramento onde as condições de exposição não possam ser completamente controladas (Suyama *et al.*, 2002).

Um trabalho de monitoramento *in loco* semelhante ao pretendido pelo nosso grupo de pesquisa está sendo realizado em São Paulo, capital, o que permitirá comparações importantes entre os resultados obtidos naquela cidade em relação ao que obtivermos em Porto Alegre (Ma, Saldiva e Rodrigues, Com. Pessoal 1998).

A poluição ambiental é ruim, tanto porque a poluição pode prejudicar a saúde pública, quanto porque ela nos perturba, nos custa dinheiro, ou nos impede de apreciar a natureza. No primeiro caso nós procuramos que a nossa água, ar, comida e lugar de moradia não sejam poluídos, porque nós não queremos ficar doentes. No segundo caso nós não queremos que haja poluição porque isso diminui a qualidade das nossas vidas. Essas duas visões representam o que é conhecido como ética ambiental antropocêntrica, ou seja, centrada no homem, que concede valor à natureza porque nós, animais autoconscientes, procuramos conservá-la (assim ela pode continuar provendo recursos) e preservá-la (assim ela pode continuar sendo apreciada por nós).

É importante desistirmos destes motivos egoístas de não queremos causar poluição ou destruir as coisas porque essas coisas têm valor para a sociedade em termos de saúde pública e qualidade de vida.

Por isso existe um segundo tipo de ética ambiental, uma que reconhece todos os motivos mencionados, mas também dá valor ao ambiente, incluindo animais, plantas e habitats. Esse é um valor intrínseco, do ambiente pelo ambiente, independentemente de qual valor nós, seres humanos, concedemos a ele (Peirce *et al.*, 1998).

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Durante dois anos, foram monitoradas as águas da bacia hidrográfica do Guaíba, em diferentes pontos, desde o verão de 1999/2000 até a primavera de 2001, na área da Grande Porto Alegre, no Sul do Brasil. Foram utilizadas planárias como organismo-teste e o ensaio Cometa para se avaliar a genotoxicidade de amostras de águas. Foram realizadas oito amostragens, uma em cada estação dos dois anos em que durou o monitoramento. As amostras de água foram coletadas em oito pontos, selecionados pelos seguintes critérios: quatro pontos na foz dos quatro principais rios formadores da bacia do Guaíba – Gravataí, Jacuí, Caí, e Sinos; dois pontos com lançamento de esgoto urbano – Ponta da Cadeia e arroio Dilúvio; um ponto com lançamento de esgoto industrial – Guaíba R; e o último ponto próximo à saída do Guaíba na Lagoa dos Patos (Guaíba LP).

Todas as amostras foram testadas usando-se planárias da espécie *G. tigrina*. Em duas amostragens (verão 2000/2001 e inverno 2001), foram empregados três grupos de planárias: *G. tigrina*, *G. schubarti*, e *G. schubarti* mixoplóide (2n/3n), para se avaliar a diferença de sensibilidade entre esses grupos.

Os resultados do teste Cometa foram comparados com resultados obtidos pelo teste de Ames para mutação gênica em amostras de águas da foz dos rios Gravataí, Sinos e Caí, e na Ponta da Cadeia, em duas coletas (verão 1999/2000 e inverno 2000).

Em um ponto reconhecido como tendo alta poluição, foi avaliada a genotoxicidade do ar pelo teste de mutação gênica nos pêlos estaminais de *Tradescantia* (*Trad*-SHM).

As principais conclusões foram as seguintes:

- a) As amostras de águas dos oito pontos avaliados apresentaram genotoxicidade significativamente superior ao controle negativo;
- b) O incremento de genotoxicidade das amostras de águas dos diversos pontos amostrados apresentou a seguinte ordem crescente: Jacuí, Ponta da Cadeia, Sinos, Guaíba LP, arroio Dilúvio, Guaíba R, Gravataí, Caí. As amostras de água da foz do Jacuí apresentaram genotoxicidade

significativamente inferior do que as amostras dos rios Gravataí e Caí; e as amostras da Ponta da Cadeia apresentaram genotoxicidade significativamente inferior às do Caí;

- c) As amostras de água coletadas no inverno tendem a apresentar maior genotoxicidade do que as amostras avaliadas no verão;
- d) A sensibilidade dos três grupos de planárias, avaliada em duas amostragens, foi similar;
- e) Não se encontrou nenhuma correlação entre os resultados do teste Cometa e os dados obtidos através do teste de Ames, nas amostras de águas dos pontos avaliados pelos dois métodos;
- f) O ar avaliado em um ponto poluído em Porto Alegre foi capaz de induzir aumento significativo de mutações pelo teste *Trad*-SHM em relação ao controle negativo.

As planárias apresentaram alta sensibilidade para detecção de genotoxicidade ambiental nas amostras de águas. Estes organismos, portanto, se forem também levados em conta os dados da literatura científica, são adequados para avaliação tanto da toxicidade em geral, como da genotoxicidade de águas. As vantagens são alta sensibilidade, baixo custo e tempo reduzido necessário para obtenção de resultados.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The waters in the Guaíba hydrographic basin was monitored at different points for two years, from summer 1999/2000 to spring 2001, in the Metropolitan Area of Porto Alegre, southern Brazil. Planarians were used as test-organisms and the Comet assay was used to assess the genotoxicity of the water samples. Eight sample collections were performed, one for each season during the two years of monitoring. The water samples were collected at eight points, chosen according to the following criteria: four points at the mouth of the four main rivers forming the Guaíba basin - Gravataí, Jacuí, Caí, and Sinos; two urban wastewater discharge points – Ponta da Cadeia and Arroio Dilúvio; one industrial wastewater discharge point – Guaíba R; and the last point close to the outflow of the Guaíba into Lagoa dos Patos (Patos Lagoon) (Guaíba LP).

All samples were tested using planarians of the *G. tigrina* species. In two collections (summer 2000/2001 and winter 2001) three groups of planarians were used: *G. tigrina*, *G. schubarti*, *G. schubarti* mixoploid (2n/3n) to assess the different sensitivities of these groups.

The results of the Comet test were compared to the results obtained using the Ames test for gene mutation in water samples from the mouth of rivers Gravataí, Sinos and Caí, and at Ponta da Cadeia, in two collections (Summer 1999/2000 and winter 2000).

Air genotoxicity was assessed at a point known for its high level of pollution using the *Tradescantia* stamen hair (gene) mutation test (*Trad*-SHM).

The main conclusions were as follows:

- a) The water samples from the eight points assessed presented significantly higher genotoxicity than the negative control;
- b) The positive genotoxicity of the water samples from the different points where they were collected presented the following increasing order: Jacuí, Ponta da Cadeia, Sinos, Guaíba LP, Arroio Dilúvio, Guaíba R, Gravataí, Caí. The water samples from the Jacuí river mouth had a significantly lower

genotoxicity than the samples from the Gravataí and Caí rivers; and the samples from Ponta da Cadeia had a significantly lower genotoxicity than those from the Caí;

- c) The water samples collected in winter tend to present higher genotoxicity than the samples assessed in summer;
- d) The three groups of planarians, assessed at two samplings, presented similar sensitivity;
- e) No correlation was found between the results of the Comet test and the data obtained using the Ames test, in the water samples from the points assessed by both methods.
- f) The air assessed at a polluted point in Porto Alegre was able to induce a significant increase in mutations using the *Trad*-SHM test as compared to the negative control;

The planarians proved to be highly sensitive to detect environmental genotoxicity in the water samples. Thus, if the data from scientific literature is taken into account, these organisms are appropriate to assess both toxicity in general and genotoxicity in water. The advantages are high sensitivity, low cost and less time needed to obtain results.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, S.K. (1995) Inhibitory effects of coffee on transplacental genotoxicity in mice, *Mutat Res*, 347, 45-52.
- Ahnstrom, G. (1988) Techniques to measure single strand breaks in cells. A review, *Int J Radiat Biol* 54, 695-707.
- Alvarado, A.S. (2000a) The case for comparative regeneration: learning from simpler organisms how to make new parts from old. Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 1, 31-36.
- Alvarado, A.S. (2000b) Regeneration in the metazoans: why does it happen?, *Bio Essays*, 22, 578-590.
- Ames, B.N. (1989) Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors, *Environ Mol Mutagen*, 14 (16), 66-77.
- Anderson, D. (2001) Factors that contribute to biomarker responses in humans including a study in individuals taking Vitamin C supplementation. *Mutat Res* 480-481, 337-347.
- Anderson, D., T.W. Yu, & M.A. Browne (1997) The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridization (FISH) assays, *Mutat Res*, 390, 69-77.
- Anderson, D., T.W. Yu, B.J. Phillips & P. Schmezer (1994) The set of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay, *Mutat Res*, 307, 261-271.
- APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, 18 ed., Washington.
- Preza, D.L.C. (1995) *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Turbellaria: Tricladida: Paludicola): aspectos biológicos e seu emprego em testes de toxicidade, Mestrado em Produção Aquática, Salvador.
- Arnaiz, R.R. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. La Ciencia para Todos. Segunda ed. México: Fondo de Cultura Económica, 1997, 95 pp.
- Ashby, J. (1991) Determination of the genotoxic status of a chemical, *Mutat Res*, 248, 221-231.
- Ashby, J. (1995) Druckrey's definition of 'genotoxic', *Mutat Res*, 329, 225.
- Atlas Ambiental de Porto Alegre (1998) coordenado por Rualdo Menegat, Maria Luiza Porto, Clóvis Carlos Carraro e Luís Alberto Dávila Fernandes, Porto Alegre, Ed. Universidade/UFRGS, 237 pp.
- Auletta, A.E., K.L. Dearfield & M.C. Cimino (1993) Mutagenicity test schemes and guidelines: U.S. EPA Office of Pollution Prevention and Toxics and Office of Pesticide Programs, *Environ Mol Mutagen*, 21, 38-45.
- Baguña, J. (1975) Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II. Mitotic studies during regeneration, and a possible mechanism of blastema formation, *J Exp Zool*, 195, 65-79.

- Baguñà, J., E. Saló, R. Romero, J. Garcia-Fernandez, D. Bueno, A.M. Muñoz-Marmol, J.R. Bayascas-Ramirez & A. Casalli (1994) Regeneration and Pattern Formation in Planarians: Cells, Molecules and Genes. *Zoological Science* 11, 781-795.
- Baguñà, J., S. Carranza, M. Pala, C. Ribeira, G. Giribet, M.A. Arnedo, M. Ribas & M. Riutort (1999) From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi, *Ital J Zool*, 66, 207-214.
- Baguñà, J., S. Carranza, M. Pala, C. Ribeira, G. Giribet, M.A. Arnedo, M. Ribas & M. Riutort (1999) From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Ital J Zool*, 66, 207-214.
- Bailey, G.S., D.E. Williams & J.D. Hendricks (1996) Fish models for environmental carcinogenesis in the rainbow trout, *Environ Health Perspect* 104 (S1), 5-21.
- Balavoine, G. & M.J. Telford (1995) Identification of planarian homeobox sequences indicates the antiquity of most Hox/homeotic gene subclasses. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 92, 7227-7231.
- Barnes, W., E. Tuley & E. Eisenstadt (1982) Base sequence analysis of his⁺ revertants of the hisG46 missense mutation in *Salmonella typhimurium*. *Environ Mutagen*, New York, 4, 297 (Abstr. Aa- 1).
- Batalha, J.R., E.T. Guimaraes, D.J. Lobo, A.J. Lichtenfels, T. Deur, H.A. Carvalho, E.S. Alves, M. Domingos, G.S. Rodrigues & P.H. Saldiva (1999) Exploring the clastogenic effects of air pollutants in Sao Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. *Mutat Res* 426, 229-232.
- Belpaeme, K., K. Cooreman & M. Kirsch-Volders (1998) Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res* 415, 167-184.
- Benazzi, M. & G. Benazzi Lentati (1976) *Animal Cytogenetics*. Vol. 1: Platyhelminthes. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Bendati, M.M., M.S.R. Schwarzbach, C.R.M. Maizonave, L.B. Almeida & M.L. Bringhenti. Avaliação da qualidade da água do lago Guaíba (Rio Grande do Sul, Brasil) como suporte para a gestão da bacia hidrográfica. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, de 3 a 8 de dezembro de 2000, nº V – 076.
- Best, J.B. & M. Morita (1982) Planarians as a model system for in vitro teratogenesis studies, *Teratog Carcinog Mutagen*, 2, 277-291.
- Best, J.B., M. Morita & B. Abbotts (1981a) Acute toxic responses of the freshwater planarian, *Dugesia dorotocephala*, to chlordane, *Bull Environ Contam Toxicol*, 26, 502-507.
- Best, J.B., M. Morita, J. Ragin & J. Best Jr. (1981b) Acute toxic responses of the freshwater planarian, *Dugesia dorotocephala*, to methylmercury, *Bull Environ Contam Toxicol*, 27, 49-54.
- Best, J.B., S. Hand & R. Rosenvold (1968) Mitosis in normal and regenerating planarians, *J Exp Zool*, 168, 157-167.
- Betti, C., T. Davini, L. Giannesi, N. Loprieno & R. Barale (1994) Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects, *Mutat Res*, 307, 323-333.

- Bombail, V., D. Aw, E. Gordon & J. Batty (2001) Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland Chemosphere 44, 383-392.
- Bornholdt, J., M. Dybdahl, U. Vogel, M. Hansen, S. Loft & H. Wallin (2002) Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice, Mutat Res 520, 63.
- Butterworth, F.M. (1995) Introduction to Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Changes, IN: Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Changes, Butterworth, F.M., L.D. Corkum & J. Guzmán-Rincón (eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-8.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2001) Variáveis de qualidade das águas. Acesso em 5 de Dezembro de 2002: www.cetesb.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Chandebois, R. (1971) Increase in the power of regeneration in planarians from lethal dose irradiation by stimulation of the cell type I system, C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 272, 1417-1419.
- Collins, A.R., S.J. Duthie & V.L. Dobson (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative damage in human lymphocyte DNA, Carcinogenesis, 14, 1733-1735.
- Congiu, A.M., S. Casu & G. Ugazio (1989) Toxicity of selenium (Na₂SeO₃) and mercury (HgCl₂) on the planarian *Dugesia gonocephala*, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 66, 87-95.
- Cotelle, S. & J.F. Féraud (1999) Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. Environ Mol Mutagen 34, 246-255.
- Crosby, D.G. Environmental Toxicology and Chemistry. Oxford: Editora Oxford University Press, 1998, 336 pp.
- Da Silva, J., T.R. de Freitas, V. Heuser, J.R. Marinho & B. Erdtmann (2000) Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test, Environ Mol Mutagen, 35, 270-278.
- De Flora, S., M. Bagnasco & P. Zanacchi, (1991) Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea, Mutat Res 258, 285-320.
- De Lucca, C.P.D. & D.H. Smith (2001) Use of newborn *Girardia tigrina* (Girard, 1850) in acute toxicity tests, Ecotoxicol Environ Saf, 50, 1-3.
- De Vries, E.J., J. Bagnasco & R. Ball (1984) Chromosomal polymorphism in planarians (*Turbellaria*, *Tricladida*) and the plate tectonics of the western Mediterranean. Institute of Taxonomic Zoology, University of Amsterdam, Genetica 62, 187-191.
- Dunn, B.P. (1991) Carcinogen adducts as an indicator for the public health risks of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. Environ Health Perspect 90, 111-116.
- El Jundi, T.A.J. & B. Erdtmann (1995) Laboratorio de Citogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive & K.L. O'Neill (1995) The Comet assay: a comprehensive review, Mutat Res, 339, 37-59.
- Ferreira, M.I., H. Petrenko, D.J. Lobo, G.S. Rodrigues, A. Moreira & P.H. Saldiva (2000) In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emissions of a solid

- waste incinerator in metropolitan Sao Paulo, Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay, *J Air Waste Manag Assoc* 50, 1852-1856.
- Freedman, B. (1995) The ecological effects of stress, IN: *Environmental Ecology. The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses*, Bill Freedman, 2nd ed, Academic Press, Inc, London, pp. 5-10.
- Gimmler-Luz, M.C., B. Erdtmann & R.A. Balbuena (1992) Analysis of clastogenic effects of Porto Alegre drinking water supplied on mouse bone marrow cells, *Mutat Res*, 279, 227-231.
- Gold, L.S., T.H. Slone, B.R. Stern, N.B. Manley & B.N. Ames (1992) Rodent carcinogens: setting priorities, *Science*, 258, 261-265.
- Green, M.H.L., J.E. Lowe, S.A. Harcourt, P. Akinluyi, T. Rowe, J. Cole, A.V. Anstey & C.F. Arlett (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and Xeroderma pigmentosum donors in the Comet assay: a potential diagnostic technique, *Mutat Res, DNA Repair*, 273, 137-144.
- Guecheva, T., J.A. Henriques & B. Erdtmann (2001) Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay), *Mutat Res* 497, 19-27.
- Guimmler-Luz, M.C., B. Erdtmann & R.A. Balbuena (1992) Analysis of clastogenic effect of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. *Mutat Res*, 279, 227-231.
- Gustafsson, M.K.S., A.M. Londholm, K. Mäntylä, M. Reuter, C.A. Lundström & N. Terenina (1998) No news on the flatworm front! Nitric oxide synthase in parasitic and free-living flatworms. *Kluwer Academic Publishers in the Netherlands, Hydrobiologia* 383, 161-166.
- Hartmann, A. & G. Speit (1995) Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE), *Mutat Res*, 346, 49-56.
- Hartmann, A. & G. Speit (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay), *Toxicol Lett*, 90, 183-188.
- Hartmann, A., K. Herkommer, M. Glück & G. Speit (1995) The DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single cell gel test (Comet assay), *Environ Mol Mutagen*, 25, 180-187.
- Hartmann, A., U. Plappert, K. Raddatz, M. Grüner-Fuchs & G. Speit (1994) Does physical activity induce DNA damage?, *Mutagen*, 9 (3), 269-272.
- Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines (1993) The assessment of mutagenicity, *Environ Mol Mutagen*, 21, 15-37.
- Henriques, J.A.P. (1987) Testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas, IN: *Genética Molecular e de Microorganismos*, Pinto, S.O. de C. (ed.), São Paulo, Manole, pp. 330-350.
- Jaeger, J.P. (2001) Dissertação de Bacharelado em Genética em andamento.
- Kawakatsu, M., I. Oki, S. Tamura, T. Yamayoshi, J. Hauser & S.M.G. Friedrich (1984) Morphological, karyological and taxonomic studies of freshwater planarians from South Brazil. VI. *D. schubarti* (Marcus 1946) from the vicinity of São Leopoldo, estado de Rio Grande do Sul (*turbellaria, triclada, paludicola*), *Bull Fuji Women's College*, 22 (II), 45-62.

- Kawakatsu, M., J. Hauser & R. Ponce De León (1992) Freshwater planarians from Uruguay and Rio Grande do Sul, Brazil: *Dugesia ururiograndeana* sp nov and *Dugesia tigrina* (Girard, 1850), *Bull Biogeogr Soc Japan*, 47 (2), 33-49.
- Kirsch, I.R. (1993) *The Causes and Consequences of Chromosomal Aberrations*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1, 534 pp.
- Klumpp, A., W. Ansel, G. Klumpp, N. Belluzzo, V. Calatayud, N. Chaplin, J.P. Garrec, H.J. Gutsche, M. Hayes, H.W. Hentze, H. Kambezidis, O. Laurent, J. Penueles, S. Rasmussen, A. Ribas, H. Ro-Poulsen, S. Rossi, M.J. Sanz, H. Shang, N. Sifakis & P. Vergne (2002) EuroBionet: a pan-European biomonitoring network for urban air quality assessment, *Environ Sci Pollut Res Int* 9, 199-203.
- Knakievicz, T. (1998) Avaliação Preliminar da Citogenética e Reprodução de Planárias de Água Doce do Sul do Brasil, Dissertação de Bacharelado, UFRGS, 83 pp.
- Koppen, G. & L. Verschaeve (1996) The alkaline Comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells, *Mutat Res (Environ Mutagen RS)* 360, 193-200.
- Kreja, L., C. Selig & W. Nothdurft (1996) Assessment of DNA damage in canine peripheral blood and bone marrow after total body irradiation using the single-cell gel electrophoresis technique, *Mutat Res*, 359, 63-70.
- Kurelec, B. (1993) The genotoxic disease syndrome, *Mar Environ Res*, 35, 341-348.
- Lau, A.H. (1998) Testes de Genotoxicidade em Planárias: Análise de Aberrações Cromossômicas e Teste Cometa, Dissertação de Mestrado, UFRGS, 83 pp.
- Legator, M.S. & J.B Ward Jr. (1991) Use of in vivo genetic toxicity data for risk assessment, *Mutat Res*, 250, 457-465.
- Lemos, C.T. & B. Erdtmann (2000) Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes, *Mutat Res*, 467, 1-9.
- Lemos, C.T. (1998) Efeito Genotóxico de Amostras Ambientais Avaliadas Por Métodos Citogenéticos in vitro e in vivo, Tese de Doutorado, UFRGS, 142 pp.
- Lemos, C.T., V.M.F. Vargas, J.A.P. Henriques & M.S. Mattevi (1994) Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial complexes. *Bull Environ Contam Toxicol*, New York 52, 848-855.
- Léonard, A., L. Fabry, G. Deknudt & G. Decat (1982) Chromosome aberrations as a measure of mutagenesis: cytogenetic extrapolation from animal to man, *Cytogenet Cell Genet*, 33, 107-113.
- Levin, D.E., E. Yamasaky & B.N. Ames (1982) A New *Salmonella* Tester Strain for the Detection of Frameshift Mutagens: A Run of Cytosines as Mutational Hot Spot, *Mutat Res*, 94, 315-330.
- Ma, T.H. & M.M. Harris (1985) In situ monitoring of environmental mutagens, *Hazard Assessment of Chemicals: Current Developments*, 4, 77-106.
- Ma, T.H. (1982) *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis) A report of the U.S. environmental protection Agency Gene-Tox program, *Mutat Res*, 99, 293-302.
- Ma, T.H. (1999) The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China, *Mutat Res*, 426, 103-106.
- Ma, T.H. (2001) Comunicação Pessoal. 8th International Conference on Environmental Mutagens, Shizuoka, Japan.

- Ma, T.H. (2001) *Tradescantia*-micronucleus bioassay for detection of carcinogens. *Folia Histochem Cytobiol* 39, Suppl 2, 54-55.
- Ma, T.H., G.L. Cabrera, A.C. Wasilewska, R. Chen, F. Loarca, A.L. Vandenberg & M.F. Salamone (1994) *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay, *Mutat Res*, 310, 211-220.
- Ma, T.H., P.H.N. Saldiva & G.S. Rodrigues (1998) Comunicação Pessoal, Curso Avaliação do Potencial Mutagênico da Poluição Urbana, USP, São Paulo.
- Mamkaev, Y. (1995) An elaboration of the evolutionary morphological basis for the systematics of the Plathelminthes. Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, *Hydrobiologia* 305, 15-19.
- Marcus, E. (1946) Sobre Turbellaria brasileiros, *Boletins da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São Paulo, Zoologia*, 11, 5-252.
- Maron, D.M. & B.N., Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat Res*, 113, 173-251.
- Mckelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo & A. Collins (1993) The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutat Res*, 288, 47-63.
- Meneghini, R. (1988) Genotoxicity of Active oxygen species in mammalian cells, *Mutat Res*, 195, 215-230.
- Merk, O. & G. Speit (1999) Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environ Mol Mutagen*, 33, 167-172.
- Miller, J.A. & E.C. Miller, (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. IN: H.H. Hiatt, J.D. Watson, J.A. Winsten (Eds.), *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 605-628.
- Mitchelmore, C.L. & J.K. Chipman (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399, 135-147.
- Mitchelmore, C.L., J.K. Chipman, P. Garcia-Martínez, P. Lemaire, L.D. Peters & D.R. Livingstone (1996) Normal status of hepatic 7-ethoxyterresorufin O-deethylase (EROD activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish following exposure to nitroaromatic compounds, *Mar Environ Res* 42 (1-4) 329-333.
- Moncada, S., R.M.J. Palmer & E.A. Riggs (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
- Monteith, D.K. & J. Vanstone (1995) Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage, *Mutat Res*, 345, 97-103.
- Mortelmans, K. & E. Zeiger (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat Res*, 455, 29-60.
- Moustacchi, E. (2000) DNA damage and repair consequences on dose-response, *Mutat Res*, 404, 33-40.
- Moutschen, J. (1985) Introduction, IN: *Introduction to Genetic Toxicology*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto and Singapore, pp. xi-xv.

- Nano, G.M., A. Binello, M.A. Bianco, G. Ugazio & S. Burdino (2002) In vitro tests to evaluate potential biological activity in natural substances, *Fitoterapia*, 73, 140-146.
- Nelson, F.R., J. Gray & F. Aikhionbare (1994) Tolerance of the planarian *Dugesia tigrina* (Tricladida: Turbellaria) to pesticides and insect growth regulators in a small-scale field study, *J Am Mosq Control Assoc*, 10, 104-105.
- Olive, P.L., G. Frazer & J.P. Banath (1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay, *Radiat Res*, 136, 130-136.
- O'Neill, K.L., D.W. Fairbairn & M.D. Standing (1993) Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy, *Mutat Res*, 319, 129-134.
- Pandurangi, R., M. Petras, S. Ralph & M. Vrzoc (1995) Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp, *Environ Mol Mutagen*, 26, 345-356.
- Peirce, J.J., R.F. Weiner & P.A. Vesilind (1997) *Environmental pollution and Control*, 4thed, Butterworth-Heinemann, Boston, Oxford, pp. 1-14.
- Pinto-Coelho, R.M. (2000) *Fundamentos em Ecologia*, Artmed, Porto Alegre, 252 pp.
- Pool-Zobel, B.L., C. Cuigas, R. Klein, C. Neudecker, H.W. Renner & P. Schmezer (1993) Assesment of genotoxic effects by lindane, *Fd Chem Toxic*, 31 (4), 271-283.
- Pool-Zobel, B.L., N. Lotzmann, M. Knoll, F. Kuchenmeister, R. Lambertz, U. Leucht, H.-G. Schroder & P. Schmezer (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples, *Environ Mol Mutagen*, 24, 23-45.
- Preza, D.L.C. (1995) *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Turbellaria: Tricladida: Paludicola): aspectos biológicos e seu emprego em testes de toxicidade, Mestrado em Produção Aquática, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- PRÓ-GUAÍBA/FEPAM (1997). *Diagnóstico da poluição gerada pelas áreas industriais localizadas na área da bacia hidrográfica do Guaíba*. Porto Alegre, 151 pp.
- Raffa, R.B. & J.M. Valdez (2001) Cocaine withdrawal in Planaria, *Eur J Pharmacol*, 430, 143-145.
- Ralph, S., M. Petras, R. Pandurangi & M. Vrzoc (1996) Alkaline single-cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environ Mol Mutagen*, 28, 112-120.
- Ribas, G., G. Frenzilli, R. Barale & R. Marcos (1995) Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, *Mutat Res*, 344, 41-54.
- Richter, C.J., W. Park & B.N. Ames (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*, 85, 6465-6467.
- Rodrigues, G. E., D. Pimentel & L.H. Weinstein (1998) In situ assesment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay, *Mutat Res*, 414, 235-244.
- Rojas, E., M. Valverde, L.A. Herrera, M. Altamirano-Lozano & P. Ostrosky-Wegman (1996) Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes, *Mutat Res*, 359, 77-84.
- Rolla, H.C. & J.A.P. Henriques (1997) Avaliação da atividade mutagênica de amostras de lodo proveniente da indústria de papel e celulose. *O Papel*, [s.l.], 12, 95-99.

- Ross, G.M., T.J. Mcmillan, P. Wilcox & A.R. Collins (1995) The single cell microgel electrophoresis assay (Comet assay): technical aspects and applications, Report On The 5th Lh Gray Trust Workshop, Institute Of Cancer Research, 1994, *Mutat Res*, 337, 57-60.
- Sáfadi, R.S. (1993) Emprego de planárias de água doce *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) na avaliação da toxicidade de compostos metálicos. Proposta metodológica, Dissertação (Mestrado em Ciências-Ecologia) IB da USP, São Paulo, 203 pp.
- Salagovic, J., J. Gilles, L. Verschaeve & I. Kalina (1996) The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assesing the biological hazards of polluted sites, *Folia Biologica (Praha)* 17-21.
- Santos-Mello, R. & B. Cavalcante (1992) Cytogenetic studies on gas station attendants, *Mutat Res*, 280, 285-290.
- Santos-Mello, R., J.C. Silva, M.H. Nunes & M.A. Braga (1992) Cytogenetics study on coke oven workers with abnormal blood counts, *Mutat Res*, 280, 261-269.
- Schürmann, W. & R. Peter (1998) Inhibition of regeneration in the planarian *Dugesia polychroa* (Schmidt) by treatment with magnesium chloride: a morphological study of wound closure, *Hydrobiologia*, 383, 111-116.
- Schürmann, W., S. Betz & R. Peter (1998) Separation and subtyping of planarian neoblasts by density-gradient centrifugation and staining, *Hydrobiologia*, 383, 117-124.
- Secretaria da Coordenação e Planejamento do Estado do Rio Grande do Sul, Secretaria Executiva do Pró-Guaíba. Baía de todas as águas: preservação e gerenciamento ambiental na bacia hidrográfica do Guaíba. Porto Alegre, 112 pp., 1998.
- Silva, J.M. & R. Santos-Mello (1996) Chromosomal aberrations in lymphocytes from car painters. *Mutat Res*, 368, 21-25.
- Silva, P.A.L. (1999) Probabilidade e Estatística. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores, 174 pp.
- Silva, R.M. (2000) Genotoxicidade associada a amostras de água do rio Caí sob influência de dejetos urbanos. Porto Alegre, Departamento de Genética, UFRGS, 100 pp. (Tese de mestrado em Genética e Biologia Molecular).
- Sina, J.F., C.L. Bean, G.R. Dysart, V.I. Taylor & M.O. Bradley (1983) Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocytes assay as a predictor or carcinogenic/mutagenic potential, *Mutat Res*, 113, 357-391.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice & E.L. Schneider (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-191.
- Smil, V. (2002) Nitrogen and food production: Proteins for human diets, *Ambio* 31, 126-131.
- Speit, G. & A. Hartmann (1996) Nachweis von Genotoxischen Umweltschadstoffen mit dem 'Comet Assay', Landesanstalt Für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, 115 pp.
- Speit, G. (1996) Comunicação Pessoal, Ciclo de palestras: Methods, Principles and Strategies of Genotoxicity Testing, ministrado no Depto. de Genética, UFRGS.

Curso: Single Cell Gel Electrophoresis Test, ministrado no Depto. de Genética, UFRGS.

- Suyama, F., E.T. Guimaraes, D.J. Lobo, G.S. Rodrigues, M. Domingos, E.S. Alves, H.A. Carvalho & P.H. Saldiva (2002) Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays, *Braz J Med Biol Res*, 35, 127-129.
- Teixeira, E.C, J.C.D. Sanchez, D. Migilacacca, R.B. Binotto & J.M.G. Fachel (2000) Environmental assessment: study of metals in fluvial sediments in sites impacted by coal processing and steel industry activities, Elsevier Science Ltd. *Fuel* 79, 1539-1546.
- The Columbia Encyclopedia, Fifth Edition Copyright (1993) Columbia University Press.
- Tice, R.R. (1995a) Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. IN: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Butterworth, F.M., L.D. Corkum & J. Guzmán-Rincón (Eds.), pp. 69-79.
- Tice, R.R. (1995b) The single cell gel / Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. IN: *Environmental Mutagenesis*, Phillips, D.H. & S. Venitt (Eds.), Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, U. K., pp. 315-339.
- Tice, R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu & Y.F. Sasaki (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing, *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-221.
- Tice, R.R., P. Andrews & M. Vasquez, (1996) Protocol for the application of the alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells, *Integrated Laboratory Systems*, pp.1-8
- Tuo, J., S. Loft, M.S. Thomsen & H.E. Poulsen (1996) Benzene-induced genotoxicity in mice in vivo detected by the alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition, *Mutat Res*, 368, 213-219.
- Vargas, V.M.F. Avaliação de Testes para Triagem e Diagnóstico de Agentes Genotóxicos Ambientais (1992) Porto Alegre, Departamento de Genética, UFRGS, 237pp. (Tese de Doutorado em Ciências).
- Vargas, V.M.F., R.R. Guidobono, C. Jordão & J.A.P. Henriques (1995) Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration / extration procedures, *Mutat Res*, 343, 31-52, 1995.
- Vargas, V.M.F., S.B. Migliavacca, A.C. Melo, R.C. Horn, R.R. Guidobono, I.C.F.S. Ferreira & M.H.D. Pestana (2001) Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants, *Mutat Res*, 490, 141-158.
- Vargas, V.M.F., V.E.P. Motta & J.A.P. Henriques (1993) Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries, *Mutat Res*, 319, 31-45.
- Verschaeve, L. & J. Gilles (1995) Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils, *Bull Environ Contam Toxicol*, 54, 112-119.

- Villella, I.V. (2001) Avaliação genotóxica pelo teste *Salmonella*/microsoma e determinação de contaminantes químicos de amostras de água superficial da bacia do Guaíba, Dissertação de Mestrado, UFRGS, 125 pp.
- Vitousek, P.M., J. Aber, R.W. Howarth, G.E. Likens, P.A. Matson, D.W. Schindler, W.H. Schlesinger & G.D. Tilman (1997) Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Causes and Consequences, *Issues in Ecology* 1, 1-17.
- White, P.A. & J.B. Rasmussen (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters, *Reviews in Mutat Res*, 410, 223-236.
- Winston, G.W. & R.T. Di Guilio, (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquat Toxicol* 19, 137-161.
- Wirth, Q.J. & Z. Heller (1985) Influência da alimentação, proteína de soja e proteína de carne no crescimento e desenvolvimento de exemplares recém eclodidos de *Dugesia schubarti* (Marcus, 1946), *Acta Biologica Leopoldensia*, VII (2), 275-284.
- Wurgler, F.E. & P.G.N, Kramers (1992) Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology), *Mutagenesis* 7, 321-327.
- Yu, M.H. (2001) Damage, Process and Action of Toxicants, IN: Environmental toxicology: impacts of environmental toxicants on living systems. Huxley College of Environmental Studies, Western Washington University, Bellingham, Washington, pp. 33-34.
- Zakrzewski, S.F. (1991) Principles of Environmental Toxicology, American Chemical Society, Washington, pp. 1-270.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Tabelas dos parâmetros físico-químicos coletados pelo DMAE organizadas por ponto de coleta .

31 Rio Gravataí

Parâmetro	Unidade	Data							
		16/2/2000	17/05/00	10/08/00	08/11/00	15/02/01	16/05/01	08/08/01	07/11/01
TEMPAG	°C	25,5	24,5	13,0	28,5	25,5	17,0	19,0	25,0
TEMPAR	°C	27,0	19,5	14,0	23,5	27,5	15,5	18,5	25,0
RT105	mg/L	229	182	121	131	114	116	100	234
RF550	mg/L	171	131	88	91	73	75	61	169
RV550	mg /L	58	51	33	40	41	41	39	65
COND	µS/cm	425,0	249,0	207,0	112,5	108,9	83,1	88,1	230,0
CLORETO	mg Cl/L	37,9	22,4	17,9	8,9	11,0	10,0	8,9	18,6
DUREZA	mg CaCO3/L	69	56	38	26	27	25	21	40
ALCT	mg CaCO3/L	112,4	71,3	57,3	30,8	31,5	22,9	25,1	52,1
PH	-	7,5	7,1	7,5	7,6	7,2	6,7	6,4	7,1
OD	mg O2/L	ND	ND	ND	2,7	0,2	7,1	3,2	ZERO
DBO	mg O2/L	19,2	16,4	20,0	6,0	2,3	4,0	3,2	12,0
DQO	mg O2/L	80,0	60,0	56,3	36,4	31,2	32,0	39,2	43,8
NH3	mg N/L	11,78	9,20	5,43	1,77	1,59	0,75	4,52	8,52
NORG	mg N/L	1,01	2,43	0,96	1,84	1,21	0,77	5,38	2,23
NO2	mg NO2/L	<0,003	0,008	0,038	0,146	0,096	0,036	0,021	0,036
NO3	mg NO3/L	0,10	0,19	0,25	1,19	0,42	0,67	0,26	0,07
PO4O	mg PO4/L	6,56	2,77	1,85	0,65	0,65	0,58	0,67	1,63
PO4T	mg PO4/L	12,69	3,25	2,69	0,87	2,83	0,80	0,95	2,84
ABS	mg MBAS/L	0,087	0,056	0,537	0,035	<0,025	0,030	0,097	0,044
FENOL	mg/L	0,009	0,011	0,008	0,009	0,003	0,005	ND	0,003
AL	mg Al/L	0,9	4,5	1,5	4,4	2,3	1,4	3,2	8,0
CD	mg Cd/L	0,001	ND	0,001	ND	ND	0,002	ND	ND
PB	mg Pb/L	<0,01	ND	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	ND	ND
CU	mg Cu/L	<0,004	0,005	0,005	0,007	0,005	<0,004	<0,004	0,007
CRT	mg Cr/L	<0,005	0,007	0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,006
HG	mg Hg/L	<0,00010	ND						
NI	mg Ni/L	0,012	ND	<0,007	ND	0,014	0,01	ND	<0,007
ZN	mg Zn/L	0,021	0,031	0,05	0,028	0,016	0,02	0,047	0,036
COLILERTTOTAL	NMP/100mL	360000	2900000	3900000	1000000	160000	430000	560000	1400000
COLILERTFECAL	NMP/100mL	44000	420000	380000	160000	52000	65000	58000	290000
A1	Org/mL	-	15,0	44,2	7,1	97,2	25,2	8,1	1,4
A2	Org/mL	-	32,5	80,6	291,1	167,4	16,8	51,3	30,8
A3	Org/mL	-	22,5	44,2	213,0	37,8	31,5	108,0	18,2
FP	Org/mL	-	77,5	96,2	191,7	286,2	98,7	156,6	149,8
PP	Org/mL	-	-	X	7,1	16,2	2,1	X	X
R	Org/mL	-	-	-	7,1	5,4	X	X	1,4
NUMTOTPLA	Org/mL	COD06	147,5	265,2	717,1	615,6	174,3	324,0	201,6

Ponto 38 PCadeia

38 Ponta da Cadeia

Parâmetro	Unidade	Data							
		07/02/00	23/05/00	28/08/00	13/11/00	07/02/01	07/05/01	13/08/01	12/11/01
TEMPAR	°C	27,0	20,0	14,5	22,0	29,0	17,5	22,0	25,0
TEMPAG	°C	26,0	18,7	16,0	23,6	28,0	17,8	14,5	23,0
RF550	mg/L	90	64	63	66	56	144	65	52
RV550	mg /L	16	40	32	22	38	49	28	26
COND	µS/cm	75,3	57,8	58,9	76,6	54,9	39,3	81,0	55,5
CLORETO	mg Cl/L	5,4	3,6	5,2	5,8	3,0	3,7	5,7	3,0
DUREZA	mg CaCO3/L	26	20	22	20	18	18	20	21
ALCT	mg CaCO3/L	21,8	23,5	18,9	24,6	20,8	16,7	24,2	19,8
PH	-	7,6	7,6	7,5	7,4	7,4	6,8	6,8	7,7
OD	mg O2/L	6,4	8,4	8,2	6,2	6,3	6,9	6,3	7,5
DBO	mg O2/L	1,9	0,6	1,1	1,6	0,2	0,8	1,3	0,7
DQO	mg O2/L	8,3	13,7	12,3	13,5	16,1	24,8	13,3	8,1
NH3	mg N/L	0,32	0,45	0,46	1,36	0,26	0,10	0,71	0,20
NORG	mg N/L	0,82	0,65	2,95	1,99	0,62	0,73	1,84	1,11
NO2	mg NO2/L	0,166	0,017	0,043	0,065	0,016	0,014	0,046	0,010
NO3	mg NO3/L	3,00	1,66	1,53	1,30	1,50	2,48	1,44	1,45
PO4O	mg PO4/L	0,15	0,14	0,14	0,12	0,17	0,12	0,29	0,06
PO4T	mg PO4/L	0,21	0,26	0,34	0,22	0,22	0,33	0,45	0,21
ABS	mg MBAS/L	ND	0,044	ND	ND	ND	ND	0,036	<0,025
FENOL	mg/L	ND	0,005	0,004	0,005	0,002	0,003	ND	ND
AL	mg Al/L	1,2	4,7	4,5	3,7	3,9	9,1	3,4	2,5
CD	mg Cd/L	ND	ND	ND	ND	0,001	ND	ND	0,002
PB	mg Pb/L	ND	ND	ND	0,01	<0,01	ND	ND	ND
CU	mg Cu/L	0,005	0,005	0,006	<0,004	<0,004	0,013	0,007	0,006
CRT	mg Cr/L	<0,005	0,005	0,008	<0,005	<0,005	0,007	<0,005	<0,005
HG	mg Hg/L	ND	0,0002	0,00014	ND	<0,00010	<0,00010	ND	ND
NI	mg Ni/L	<0,007	<0,007	ND	<0,007	<0,007	ND	ND	0,008
ZN	mg Zn/L	0,021	0,010	0,004	0,008	0,017	0,054	0,013	0,022
COLILERTTOTAL	NMP/100mL	3200	2400	19000	120000	10000	19000	28000	4400
COLILERTFECAL	NMP/100mL	170	77	770	11000	400	1300	2000	310

Ponto 40 Dilúvio

Parâmetro	Unidade	Data						
		23/05/00	28/08/00	13/11/00	07/02/01	07/05/01	13/08/01	12/11/01
TEMPAR	°C	20,0	14,5	22,0	32,0	17,0	24,0	23,5
TEMPAG	°C	20,5	15,0	22,5	28,0	18,0	18,0	23,0
RT105	mg/L	251	305	132	145	150	99	183
RF550	mg/L	166	89	99	107	102	70	135
RV550	mg /L	85	216	33	38	48	29	48
COND	µS/cm	404,0	149,7	164,1	255,0	277,0	92,1	261,0
CLORETO	mg Cl/L	29,3	13,4	11,2	19,8	16,9	6,5	17,4
DUREZA	mg CaCO3/L	61	40	36	37	53	26	67
ALCT	mg CaCO3/L	132,6	37,8	43,8	69,3	66,9	28,1	75,9
PH	-	7,5	7,4	7,4	7,6	7,0	6,7	7,3
OD	mg O2/L	ND	5,0	2,6	0,9	5,5	4,9	0,6
DBO	mg O2/L	22,5	5,1	6,6	9,0	10,8	1,4	12,0
DQO	mg O2/L	55,7	26,5	24,3	33,4	42,0	17,1	28,5
NH3	mg N/L	10,46	2,28	3,16	5,81	4,63	1,68	4,07
NORG	mg N/L	1,82	3,00	2,23	1,43	1,62	1,43	1,78
NO2	mg NO2/L	0,007	0,322	0,411	0,213	0,579	0,067	0,792
NO3	mg NO3/L	0,22	4,02	1,85	0,56	0,87	0,40	1,69
PO4O	mg PO4/L	2,75	0,44	0,61	2,16	1,26	0,40	1,35
PO4T	mg PO4/L	3,20	0,68	1,31	3,84	1,85	0,61	2,25
ABS	mg MBAS/L	1,502	0,036	0,028	<0,025	0,068	0,031	0,038
FENOL	mg/L	0,003	ND	0,002	0,008	0,005	ND	0,002
AL	mg Al/L	0,3	2,0	5,3	1,6	1,0	3,6	1,5
CD	mg Cd/L	ND	ND	0,001	0,001	ND	0,001	ND
PB	mg Pb/L	ND	ND	0,01	<0,01	ND	<0,01	<0,01
CU	mg Cu/L	0,012	0,006	0,013	0,016	0,015	0,004	0,008
CRT	mg Cr/L	<0,005	0,005	0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
HG	mg Hg/L	0,00022	<0,00010	ND	0,00017	ND	ND	<0,00010
NI	mg Ni/L	<0,007	ND	<0,007	<0,007	ND	<0,007	ND
ZN	mg Zn/L	0,015	0,003	0,054	0,006	0,020	0,021	0,013
COLI TOTAL	NMP/100mL	2400000	680000	4100000	1100000	2600000	240000	2400000
E. COLI	NMP/100mL	440000	46000	580000	110000	470000	27000	290000

40 Arroio Dilúvio

51b Guaíba R

Parâmetro	Unidade	Data							
		08/02/00	23/05/00	29/08/00	16/11/00	08/02/01	08/05/01	14/08/01	13/11/01
TEMPAR	°C	24,0	18,0	11,5	19,0	27,5	17,5	21,5	23,0
TEMPAG	°C	26,0	19,0	15,5	22,6	27,0	18,3	18,0	24,0
RT105	mg/L	214	174	358	160	164	107	239	129
RF550	mg/L	175	127	170	116	117	75	203	94
RV550	mg /L	39	47	188	44	47	32	36	35
COND	µS/cm	188,1	186,9	139,1	174,9	119,1	38,7	273,0	277,0
CLORETO	mg Cl/L	23,3	20,0	12,4	10,4	12,7	3,8	31,7	17,0
DUREZA	mg CaCO3/L	25	26	22	20	18	16	22	18
ALCT	mg CaCO3/L	23,7	25,9	24,8	22,7	21,9	15,3	20,0	22,8
PH	-	7,5	7,4	7,4	7,7	7,6	6,8	6,7	7,2
OD	mg O2/L	7,1	8,0	8,7	7,6	6,8	6,5	7,8	6,8
DBO	mg O2/L	1,6	0,8	1,2	1,2	0,9	0,8	0,8	0,8
DQO	mg O2/L	14,9	20,4	15,8	13,2	19,0	21,2	20,6	23,8
NH3	mg N/L	0,50	0,85	0,20	0,56	0,17	0,13	1,06	1,32
NORG	mg N/L	0,79	0,54	0,83	1,31	0,56	0,73	1,38	0,60
NO2	mg NO2/L	0,067	0,019	0,032	0,015	0,005	0,004	0,014	0,022
NO3	mg NO3/L	2,64	1,70	0,88	1,81	0,91	1,13	0,77	1,30
PO4O	mg PO4/L	0,16	0,16	0,11	0,13	0,12	0,16	0,09	0,22
PO4T	mg PO4/L	0,24	0,26	0,35	0,31	0,18	0,45	0,24	0,39
ABS	mg MBAS/L	ND	<0,025	ND	ND	ND	ND	<0,025	<0,025
FENOL	mg/L	0,003	0,003	0,005	0,005	0,004	0,002	<0,001	0,001
AL	mg Al/L	2,7	4,7	4,7	5,7	4,5	6,2	4,9	3,4
CD	mg Cd/L	ND	0,001	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PB	mg Pb/L	ND	0,01	ND	<0,01	ND	ND	ND	ND
CU	mg Cu/L	0,004	<0,004	0,006	0,004	0,005	0,006	0,004	0,004
CRT	mg Cr/L	<0,005	0,005	0,013	0,006	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
HG	mg Hg/L	ND	ND	0,00016	ND	<0,00010	<0,00010	<0,00010	ND
NI	mg Ni/L	<0,007	0,007	ND	<0,007	ND	ND	ND	ND
ZN	mg Zn/L	0,024	0,018	0,009	0,010	0,022	0,022	0,001	0,012
COLI TOTAL	NMP/100mL	6200	12000	2300	4600	1300	6900	15000	5800
E. COLI	NMP/100mL	820	1000	210	1300	52	220	1700	570
A1	Org/mL	150,4	-	-	X	3,0	10,8	-	10,2
A2	Org/mL	47,0	-	45,6	25,2	9,0	5,4	16,2	40,8
A3	Org/mL	141,0	-	77,9	43,2	60,0	21,6	45,9	68,0
FP	Org/mL	150,4	-	11,4	14,4	13,5	45,9	126,9	81,6
PP	Org/mL	-	-	X	-	X	2,7	8,1	X
R	Org/mL	X	-	-	-	-	-	-	X
NUMTOTPLA	Org/mL	488,8	-	138,7	82,8	85,5	86,4	197,1	200,6

57 Rio Jacuí

Parâmetro	Unidade	Data							
		16/02/00	17/05/00	10/08/00	08/11/00	15/02/01	16/05/01	08/08/01	07/11/01
TEMPAR	°C	24,0	19,0	10,5	23,5	25,0	17,0	18,0	25,0
TEMPAG	°C	26,0	18,0	13,9	23,0	27,5	17,0	17,9	24,5
RT105	mg/L	78	90	62	135	76	88	77	84
RF550	mg/L	57	73	48	70	55	60	52	55
RV550	mg /L	21	17	14	65	21	28	25	29
COND	µS/cm	56,6	50,5	54,0	52,0	47,4	41,9	48,4	55,0
CLORETO	mg Cl/L	3,3	3,2	2,9	3,4	2,7	2,6	2,4	3,2
DUREZA	mg CaCO3/L	22	19	-	16	-	21	-	19
ALCT	mg CaCO3/L	20	20,1	-	18,1	COD24	41,8	18,5	15,1
PH	-	7,80	7,20	8,00	7,60	7,80	7,00	6,80	7,90
OD	mg O2/L	6,60	8,70	10,00	8,20	7,00	8,30	8,90	8,30
DBO	mg O2/L	COD19	0,6	0,8	0,6	0,5	1,0	0,6	1,4
DQO	mg O2/L	14,2	15,3	5,4	11,2	9,3	13,6	8,0	9,2
NH3	mg N/L	0,30	0,24	0,52	0,14	0,10	0,03	0,64	0,78
NORG	mg N/L	1,00	1,26	1,30	1,31	0,52	0,31	0,73	0,75
NO2	mg NO2/L	0,008	0,016	0,027	0,006	0,006	<0,003	0,01	0,005
NO3	mg NO3/L	1,79	1,10	0,95	1,11	2,05	1,20	1,00	0,59
PO4O	mg PO4/L	0,09	0,15	0,10	0,11	0,11	0,10	0,10	0,08
PO4T	mg PO4/L	0,18	0,35	0,16	0,12	0,21	0,50	0,19	0,14
ABS	mg MBAS/L	ND	<0,025	<0,025	<0,025	ND	ND	ND	ND
FENOL	mg/L	ND	COD08	-	-	-	0,003	-	ND
AL	mg Al/L	2,40	4,50	2,00	6,60	3,00	3,30	4,60	2,50
CD	mg Cd/L	ND	ND	ND	ND	ND	0,001	ND	ND
PB	mg Pb/L	ND	ND	ND	ND	<0,01	ND	ND	ND
CU	mg Cu/L	0,004	0,004	<0,004	0,005	0,004	<0,004	0,004	<0,004
CRT	mg Cr/L	<0,005	0,005	0,007	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
HG	mg Hg/L	ND	<0,00010	ND	ND	<0,00010	ND	ND	ND
NI	mg Ni/L	ND	ND	<0,007	ND	<0,007	0,007	ND	<0,007
ZN	mg Zn/L	0,022	0,005	0,005	0,017	0,003	0,032	0,042	0,022
COLLERTTOTAL	NMP/100mL	1700	980	1000	3800	2000	2400	1600	720
COLLERTFECAL	NMP/100mL	26	46	54	82	75	40	52	<10
A1	Org/mL	5,1	2,4	X	1,7	1,7	X	7,0	X
A2	Org/mL	27,2	17,6	61,2	35,7	34,0	6,8	28,0	121,5
A3	Org/mL	49,3	38,8	170,0	22,1	27,2	8,5	126,0	129,0
FP	Org/mL	8,5	7,2	159,8	54,4	42,5	22,1	77,0	117,0
PP	Org/mL	1,7	X	10,2	X	X	-	3,5	1,5
R	Org/mL	3,4	0,8	-	X	-	X	X	3,0
NUMTOTPLA	Org/mL	95,2	66,8	401,2	113,9	105,4	37,4	248,5	372,0

58 Rio Caí

Parâmetro	Unidade	Data							
		16/02/00	17/05/00	10/08/00	08/11/00	15/02/01	16/05/01	08/08/01	07/11/01
TEMPAR	°C	24,0	17,0	10,0	25,0	25,0	17,0	17,5	26,0
TEMPAG	°C	26,0	18,0	13,3	23,4	27,0	16,4	17,2	25,5
RT105	mg/L	112	104	162	116	130	69	91	106
RF550	mg/L	83	74	61	92	68	51	64	74
RV550	mg /L	29	30	101	24	62	18	27	32
COND	µS/cm	128,4	93,6	119,7	92,1	73,9	71,0	82,3	117,6
CLORETO	mg Cl/L	13,8	8,0	11,2	7,1	5,9	5,5	5,8	10,0
DUREZA	mg CaCO3/L	28	38	-	40	-	-	-	30
ALCT	mg CaCO3/L	28,6	25,3	-	25,6	24,6	-	22,1	24,6
PH	-	7,4	7,2	7,8	7,8	7,7	6,8	6,5	7,5
OD	mg O2/L	4,7	6,7	9,5	8,0	5,3	7,1	6,5	7,3
DBO	mg O2/L	1,5	0,6	1,3	1,6	0,9	0,8	0,2	2,7
DQO	mg O2/L	20,7	15,9	11,7	17,5	14,9	10,8	12,6	13,1
NH3	mg N/L	0,58	0,57	0,83	0,12	0,39	0,09	0,15	0,58
NORG	mg N/L	0,71	1,06	1,28	1,91	0,66	0,45	0,94	1,26
NO2	mg NO2/L	0,408	0,079	0,106	0,074	0,046	0,039	0,043	0,123
NO3	mg NO3/L	1,79	3,41	3,64	2,53	0,72	1,41	2,49	1,03
PO4O	mg PO4/L	0,20	0,22	0,15	0,08	0,16	0,18	0,15	0,12
PO4T	mg PO4/L	0,27	0,32	0,23	0,13	0,22	0,26	0,25	0,23
ABS	mg MBAS/L	<0,025	<0,025	<0,025	0,025	ND	0,088	<0,025	ND
FENOL	mg/L	0,003	COD08	-	-	-	-	ND	0,001
AL	mg Al/L	3,6	3,2	1,2	3,4	2,1	1,4	2,3	1,0
CD	mg Cd/L	ND	ND	0,001	ND	ND	0,001	ND	ND
PB	mg Pb/L	ND	ND	<0,01	ND	ND	<0,01	ND	ND
CU	mg Cu/L	0,006	0,005	<0,004	0,007	0,004	0,005	0,005	<0,004
CRT	mg Cr/L	<0,005	0,006	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,005	<0,005
HG	mg Hg/L	ND	ND	<0,00010	ND	<0,00010	ND	ND	ND
NI	mg Ni/L	<0,007	ND	0,008	<0,007	0,007	0,007	ND	ND
ZN	mg Zn/L	0,03	0,007	0,026	0,018	0,026	0,024	0,016	0,021
COLI TOTAL	NMP/100mL	3500	1700	2000	3500	2900	3200	2400	1500
E. COLI	NMP/100mL	110	71	87	110	61	73	110	63
A1	Org/mL	X	3,4	24,0	228,0	X	1,7	6,0	3,3
A2	Org/mL	108,8	54,4	264,0	15468,0	66,3	28,9	72,0	280,5
A3	Org/mL	180,2	141,1	4416,0	144,0	13,6	25,5	345,0	409,2
FP	Org/mL	51,0	37,4	528,0		35,7	30,6	55,5	392,7
PP	Org/mL	X	1,7	12,0	-	-	X	X	33,0
R	Org/mL	X	-	-	-	-	X	-	6,6
NUMTOTPLA	Org/mL	340,0	239,7	5244,0	15840,0	115,6	86,7	478,5	1125,3

59 Rio dos Sinos

Parâmetro	Unidade	Data							
		17/02/00	18/05/00	08/08/00	07/11/00	14/02/01	15/05/01	07/08/01	06/11/01
TEMPAR	°C	22,5	18,0	18,0	27,0	28,0	14,0	16,0	30,0
TEMPAG	°C	25,7	17,0	14,0	22,0	27,0	15,9	17,0	24,5
RT105	mg/L	114	124	110	111	95	93	97	138
RF550	mg/L	83	85	89	92	68	59	66	97
RV550	mg /L	31	39	21	19	27	34	31	41
COND	µS/cm	136,9	141,7	181,6	111,4	101,7	73,9	85,6	119,9
CLORETO	mg Cl/L	14,5	14,7	18,3	19,2	7,4	7,0	7,3	11,6
DUREZA	mg CaCO3/L	26	-	35	30	29	25	24	29
ALCT	mg CaCO3/L	33,5	35,6	45,4	19,3	47,5	27,5	26,9	30,8
PH	-	7,3	7,3	7,3	7,5	7,4	6,8	6,4	7,0
OD	mg O2/L	2,4	4,5	3,3	4,9	3,2	5,3	5,7	2,8
DBO	mg O2/L	1,3	1,2	3,2	2,9	2,1	1,1	1,1	1,8
DQO	mg O2/L	21,0	18,0	17,9	15,3	12,1	15,2	14,1	17,3
NH3	mg N/L	2,04	1,66	2,76	0,85	0,72	0,23	0,73	2,26
NORG	mg N/L	0,97	1,30	1,14	1,14	0,82	0,35	1,34	1,16
NO2	mg NO2/L	0,260	0,147	0,107	0,188	0,115	0,036	0,034	0,231
NO3	mg NO3/L	1,77	1,30	1,97	1,48	0,75	0,91	1,29	0,66
PO4O	mg PO4/L	0,52	0,41	0,54	0,27	0,31	0,21	0,23	0,39
PO4T	mg PO4/L	0,57	0,63	0,78	0,39	0,43	0,38	0,35	0,63
ABS	mg MBAS/L	ND	ND	0,319	0,028	ND	ND	<0,025	<0,025
FENOL	mg/L	-	-	0,003	0,008	0,003	0,003	<0,001	<0,001
AL	mg Al/L	2,7	2,9	0,7	2,4	1,5	2	3,1	3,2
CD	mg Cd/L	ND							
PB	mg Pb/L	ND	ND	<0,01	<0,01	ND	ND	ND	0,02
CU	mg Cu/L	0,004	<0,004	<0,004	0,004	<0,004	<0,004	0,005	0,004
CRT	mg Cr/L	0,006	0,009	0,009	<0,005	<0,005	<0,005	0,005	0,008
HG	mg Hg/L	ND	ND	ND	ND	<0,00010	ND	ND	ND
NI	mg Ni/L	<0,007	ND	<0,007	ND	ND	<0,007	0,008	ND
ZN	mg Zn/L	0,057	0,014	0,015	0,021	0,009	0,014	0,04	0,032
COLI TOTAL	NMP/100mL	31000	44000	460000	50000	58000	28000	12000	31000
E. COLI	NMP/100mL	4300	2900	990	8200	5500	2500	980	6400
A1	Org/mL	10,2	1,7	24,0	10,5	X	7,5	41,6	7,2
A2	Org/mL	146,2	28,9	528,0	157,5	36,0	15,0	70,4	81,0
A3	Org/mL	98,6	69,7	4848,0	539,0	58,0	25,0	188,8	122,4
FP	Org/mL	64,6	23,8	312,0	220,5	48,0	127,5	262,4	79,2
PP	Org/mL	X	10,2	X	X	2,0	-	6,4	5,4
R	Org/mL	-	-	-	-	2,0	-	X	1,8
NUMTOTPLA	Org/mL	319,6	136,0	5712,0	927,5	146,0	175,0	569,6	297,0

61 Guaíba LP

Parâmetro	Unidade								
		09/02/00	25/05/00	30/08/00	17/11/00	19/02/01	10/05/01	15/08/01	14/11/01
TEMPAR	°C	27	23	15,5	21	29	17	24	25
TEMPAG	°C	26	18	15	21,1	28,5	18,1	18	23
RT105	mg/L	85	104	88	97	87	96	114	101
RF550	mg/L	65	71	74	66	64	68	65	75
RV550	mg /L	20	33	14	31	23	28	49	26
COND	µS/cm	70,3	61,8	73	59,2	53,8	44,1	56,6	62,1
CLORETO	mg Cl/L	5,5	4,7	4,5	3,9	3,2	3,3	3,5	4
DUREZA	mg CaCO3/L	26	26	24	18	18	18	19	20
ALCT	mg CaCO3/L	22,6	22,3	25	50,2	20,3	18,3	16,8	19,8
PH	-	8,4	7,9	7,8	8	8,2	7,2	7,3	7,9
OD	mg O2/L	7,8	8,2	9,2	8,2	7,3	7,8	8,5	7,9
DBO	mg O2/L	1,5	0,9	0,8	1,2	3,8	0,6	1,2	1,5
DQO	mg O2/L	15,8	16,5	10,3	12,6	9,9	13,9	15,7	9,7
NH3	mg N/L	0,27	0,12	0,32	0,29	0,2	0,15	1	0,27
NORG	mg N/L	0,82	1,01	0,63	0,95	0,72	0,58	1,19	0,95
NO2	mg NO2/L	0,08	0,046	0,04	0,057	0,024	0,016	0,147	0,01
NO3	mg NO3/L	1,27	1,78	1,67	5,83	2,31	1,88	0,98	1,36
PO4O	mg PO4/L	0,06	0,19	0,14	0,11	0,07	0,15	0,13	0,16
PO4T	mg PO4/L	0,15	0,29	0,33	0,35	0,18	0,36	0,27	0,41
ABS	mg MBAS/L	ND	<0,025	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FENOL	mg/L	ND	0,001	0,004	0,004	0,002	0,003	0,001	ND
AL	mg Al/L	1,7	4,8	3,1	5,4	3,5	4,1	5,7	3,9
CD	mg Cd/L	ND	0,002	ND	ND	ND	0,002	ND	ND
PB	mg Pb/L	<0,01	ND	ND	ND	<0,01	ND	ND	ND
CU	mg Cu/L	<0,004	0,006	0,006	0,004	0,007	0,006	0,004	0,005
CRT	mg Cr/L	<0,005	<0,005	0,009	0,006	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
HG	mg Hg/L	ND	ND	0,00021	ND	<0,00010		<0,00010	ND
NI	mg Ni/L	<0,007	<0,007	ND	<0,007	ND	<0,007	<0,007	<0,007
ZN	mg Zn/L	0,013	0,022	0,008	0,011	0,015	0,029	0,001	0,017
COLILERTTOTAL	NMP/100mL	310	440	5000	550	1400	2400	1200	770
COLILERTFECAL	NMP/100mL	<1	30	650	29	130	190	96	4
A1	Org/mL	103,8	2,8	X		22,5	3,6	X	20,7
A2	Org/mL	449,8	16,8	177,1	19,5	65	19,2	28	80,5
A3	Org/mL	1903	43,4	1108,8	312	85	14,4	19,6	356,5
FP	Org/mL	138,4	35	69,3	81	125	38,4	168	78,2
PP	Org/mL	X	1,4	X	6	5	2,4	X	6,9
R	Org/mL	X	1,4	X	1,5	X	X	2,8	X
NUMTOTPLA	Org/mL	2595	100,8	1355,2	420	302,5	78	218,4	542,8

ANEXO 2. Listagem dos códigos dos parâmetros coletados.

Código do Parâmetro	Parâmetro
A1	CYANOPHYTA
A2	CHLOROPHYTA
A3	CHRYSOPHYTA
ABS	SURFACTANTES
AL	ALUMÍNIO
ALCT	ALCALINIDADE TOTAL
CD	CÁDMIO
CLORETO	CLORETO
CNEG	CONTROLE NEGATIVO
COLFECAL	COLIFORMES FECAIS
COLTOTAL	COLIFORMES TOTAIS
COND	CONDUTIVIDADE
CPOS	CONTROLE POSITIVO
CRT	CROMO TOTAL
CU	COBRE
DANO	ÍNDICE DE DANO
DBO	DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO
DELTANEG	ÍNDICE DE DANO MENOS CONTROLE NEGATIVO
DQO	DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO
DUREZA	DUREZA
ECOLI	<i>Escherichia coli</i>
ESTANRO	ESTAÇÃO DO ANO
FENOL	FENOL
FP	FLAGELADO PIGMENTADO
HG	MERCÚRIO
NH3	AMÔNIA
NI	NÍQUEL
NO2	NITRITO
NO3	NITRATO
NORG	NITROGÊNIO ORGÂNICO
NTOTPLA	NÚMERO TOTAL DE PLÂNCTON
OD	OXIGÊNIO DISSOLVIDO
PLUVTOT	PLUVIOSIDADE TOTAL
PB	CHUMBO
PH	PH
PO4O	FOSFATO ORTO
PO4T	FOSFATO TOTAL
PONTO	PONTO DE COLETA
PP	PROTOZOA
R	ROTIFERA
RF550	RESÍDUO TOTAL FIXO A 550°C
RT105	RESÍDUO TOTAL 105°C
RV550	RESÍDUO TOTAL VOLÁTIL A 550°C
TEMPAG	TEMPERATURA DA ÁGUA
TEMPAR	TEMPERATURA DO AR
ZN	ZINCO

ANEXO 3. Tabelas de correlações entre parâmetros biológicos e físico-químicos medidos.

Correlações

		DELTANEG	PONTO	ESTANRO	DANO	CNEG	CPOS
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	-,076	,193	,951**	-,006	,171
	Sig. (bilateral)	,	,552	,127	,000	,961	,173
	N	64	64	64	64	64	64
PONTO	Correlação de Pearson	-,076	1,000	,000	-,073	,000	,000
	Sig. (bilateral)	,552	,	1,000	,567	1,000	1,000
	N	64	64	64	64	64	64
ESTANRO	Correlação de Pearson	,193	,000	1,000	,358**	,564**	,761**
	Sig. (bilateral)	,127	1,000	,	,004	,000	,000
	N	64	64	64	64	64	64
DANO	Correlação de Pearson	,951**	-,073	,358**	1,000	,303*	,430**
	Sig. (bilateral)	,000	,567	,004	,	,015	,000
	N	64	64	64	64	64	64
CNEG	Correlação de Pearson	-,006	,000	,564**	,303*	1,000	,864**
	Sig. (bilateral)	,961	1,000	,000	,015	,	,000
	N	64	64	64	64	64	64
CPOS	Correlação de Pearson	,171	,000	,761**	,430**	,864**	1,000
	Sig. (bilateral)	,178	1,000	,000	,000	,000	,
	N	64	64	64	64	64	64

** - Correlação é significativa em nível de 0,01 (bilateral).

* - Correlação é significativa em nível de 0,05 (bilateral).

Correlações

		DELTANEG	TEMPAR	TEMPAG	RT105	RF550	RV550	COND	CLORETO	DUREZA	ALCT	PH
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	,089	,094	,278*	,254*	,205	,267*	,300*	,147	,075	-,056
	Sig. (bilateral)		,488	,464	,027	,045	,107	,034	,017	,283	,570	,664
	N	64	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
TEMPAR	Correlação de Pearson	,089	1,000	,859**	-,120	,078	-,290*	,082	,084	,041	,043	,285*
	Sig. (bilateral)	,488		,000	,348	,544	,021	,521	,512	,766	,744	,023
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
TEMPAG	Correlação de Pearson	,094	,859**	1,000	-,049	,106	-,199	,113	,087	,044	,064	,406**
	Sig. (bilateral)	,464	,000		,702	,408	,119	,380	,497	,750	,629	,001
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
RT105	Correlação de Pearson	,278*	-,120	-,049	1,000	,841**	,813**	,627**	,653**	,427**	,420**	-,067
	Sig. (bilateral)	,027	,348	,702		,000	,000	,000	,000	,001	,001	,600
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
RF550	Correlação de Pearson	,254*	,078	,106	,841**	1,000	,368**	,750**	,802**	,477**	,475**	-,104
	Sig. (bilateral)	,045	,544	,408	,000		,003	,000	,000	,000	,000	,416
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
RV550	Correlação de Pearson	,205	-,290*	-,199	,813**	,368**	1,000	,270*	,259*	,225	,212	-,004
	Sig. (bilateral)	,107	,021	,119	,000	,003		,032	,041	,099	,103	,978
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
COND	Correlação de Pearson	,267*	,082	,113	,627**	,750**	,270*	1,000	,930**	,775**	,807**	-,072
	Sig. (bilateral)	,034	,521	,380	,000	,000	,032		,000	,000	,000	,574
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
CLORETO	Correlação de Pearson	,300*	,084	,087	,653**	,802**	,259*	,930**	1,000	,679**	,674**	-,120
	Sig. (bilateral)	,017	,512	,497	,000	,000	,041	,000		,000	,000	,548
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63
DUREZA	Correlação de Pearson	,147	,041	,044	,427**	,477**	,225	,775**	,679**	1,000	,859**	-,023
	Sig. (bilateral)	,283	,766	,750	,001	,000	,099	,000	,000		,000	,870
	N	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
ALCT	Correlação de Pearson	,075	,043	,064	,420**	,475**	,212	,807**	,674**	,859**	1,000	,018
	Sig. (bilateral)	,570	,744	,629	,001	,000	,103	,000	,000	,000		,890
	N	60	60	60	60	60	60	60	60	55	60	60
PH	Correlação de Pearson	-,056	,285*	,406**	-,067	-,104	-,004	-,072	-,120	-,023	,018	1,000
	Sig. (bilateral)	,664	,023	,001	,600	,416	,978	,574	,348	,870	,890	
	N	63	63	63	63	63	63	63	63	55	60	63

*. Correlação é significativa em nível de 0,01 (bilateral).

**. Correlação é significativa em nível de 0,05 (bilateral).

Correlações

		DELTANEG	OD	DBO	DQO	NH3	NORG	NO2	NO3
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	-,158	,033	,144	,180	,340**	,019	,023
	Sig. (bilateral)	,	,217	,800	,260	,159	,006	,882	,858
	N	64	63	63	63	63	63	63	63
OD	Correlação de Pearson	-,158	1,0	-,676**	-,755**	-,779**	-,338**	-,356**	,389**
	Sig. (bilateral)	,217	,	,000	,000	,000	,007	,004	,002
	N	63	63	63	63	63	63	63	63
DBO	Correlação de Pearson	,033	-,676**	1,00	,802**	,826**	,246	,184	-,316*
	Sig. (bilateral)	,800	,000	,	,000	,000	,052	,150	,012
	N	63	63	63	63	63	63	63	63
DQO	Correlação de Pearson	,144	-,755**	,802**	1,00	,904**	,345**	,130	-,415**
	Sig. (bilateral)	,260	,000	,000	,	,000	,006	,309	,001
	N	63	63	63	63	63	63	63	63
NH3	Correlação de Pearson	,180	-,779**	,826**	,904**	1,00	,405**	,162	-,418**
	Sig. (bilateral)	,159	,000	,000	,000	,	,001	,205	,001
	N	63	63	63	63	63	63	63	63
NORG	Correlação de Pearson	,340**	-,338**	,246	,345**	,405**	1,000	,197	-,103
	Sig. (bilateral)	,006	,007	,052	,006	,001	,	,122	,422
	N	63	63	63	63	63	63	63	63
NO2	Correlação de Pearson	,019	-,356**	,184	,130	,162	,197	1,000	,124
	Sig. (bilateral)	,882	,004	,150	,309	,205	,122	,	,332
	N	63	63	63	63	63	63	63	63
NO3	Correlação de Pearson	,023	,389**	-,316*	-,415**	-,418**	-,103	,124	1,00
	Sig. (bilateral)	,858	,002	,012	,001	,001	,422	,332	,
	N	63	63	63	63	63	63	63	63

**· Correlação é significativa em nível de 0,01 (bilateral).

*· Correlação é significativa em nível de 0,05 (bilateral).

Correlações

		DELTANEG	PO4O	PO4T	ABS	FENOL
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	,078	,059	-,015	-,052
	Sig. (bilateral)	,	,542	,648	,906	,719
	N	64	63	63	63	51
PO4O	Correlação de Pearson	,078	1,000	,972**	,292*	,552**
	Sig. (bilateral)	,542	,	,000	,020	,000
	N	63	63	63	63	51
PO4T	Correlação de Pearson	,059	,972**	1,000	,242	,503**
	Sig. (bilateral)	,648	,000	,	,056	,000
	N	63	63	63	63	51
ABS	Correlação de Pearson	-,015	,292*	,242	1,000	,301*
	Sig. (bilateral)	,906	,020	,056	,	,032
	N	63	63	63	63	51
FENOL	Correlação de Pearson	-,052	,552**	,503**	,301*	1,000
	Sig. (bilateral)	,719	,000	,000	,032	,
	N	51	51	51	51	51

**· Correlação é significativa em nível de 0,01 (bilateral).

*· Correlação é significativa em nível de 0,05 (bilateral).

Correlações

		DELTANEG	AL	CD	PB	CU	CRT	HG	NI	ZN
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	-,005	-,223	,109	-,079	,092	,020	,014	-,048
	Sig. (bilateral)	,	,970	,078	,395	,536	,475	,877	,916	,707
	N	64	63	63	63	63	63	62	63	63
AL	Correlação de Pearson	-,005	1,0	-,084	,072	,161	,245	-,063	-,272*	,167
	Sig. (bilateral)	,970	,	,512	,573	,209	,053	,624	,031	,191
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63
CD	Correlação de Pearson	-,223	-,084	1,0	-,005	,013	-,219	-,070	,360**	,156
	Sig. (bilateral)	,078	,512	,	,972	,920	,085	,586	,004	,223
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63
PB	Correlação de Pearson	,109	,072	-,005	1,0	-,016	,215	-,072	-,027	,153
	Sig. (bilateral)	,395	,573	,972	,	,903	,090	,578	,834	,231
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63
CU	Correlação de Pearson	-,079	,161	,013	-,016	1,0	,019	,367**	-,195	,153
	Sig. (bilateral)	,536	,209	,920	,903	,	,885	,003	,125	,232
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63
CRT	Correlação de Pearson	,092	,245	-,219	,215	,019	1,00	,302*	-,184	,014
	Sig. (bilateral)	,475	,053	,085	,090	,885	,	,017	,149	,915
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63
HG	Correlação de Pearson	,020	-,063	-,070	-,072	,367**	,302*	1,0	-,126	-,265*
	Sig. (bilateral)	,877	,624	,586	,578	,003	,017	,	,328	,037
	N	62	62	62	62	62	62	62	62	62
NI	Correlação de Pearson	,014	-,272*	,360**	-,027	-,195	-,184	-,126	1,0	,081
	Sig. (bilateral)	,916	,031	,004	,834	,125	,149	,328	,	,526
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63
ZN	Correlação de Pearson	-,048	,167	,156	,153	,153	,014	-,265*	,081	1,0
	Sig. (bilateral)	,707	,191	,223	,231	,232	,915	,037	,526	,
	N	63	63	63	63	63	63	62	63	63

*. Correlação é significativa em nível de 0,01 (bilateral).

**. Correlação é significativa em nível de 0,05 (bilateral).

Correlações

		DELTANEG	COLTOTAL	COLFECAL	ECOLI	A1	A2	A3	FP	PP	R	NTOTPLA	PLUVTOT
DELTANEG	Correlação de Pearson	1,000	,004	,240	,015	,138	,016	,173	,293*	,209	,014	,098	,270
	Sig. (bilateral)	,	,972	,185	,904	,354	,912	,238	,043	,154	,923	,513	,092
	N	64	63	32	63	47	48	48	48	48	48	47	40
COLTOTAL	Correlação de Pearson	,004	1,000	,959**	,967**	,031	-,047	-,04	,043	-,11	-,02	-,053	,229
	Sig. (bilateral)	,972	,	,000	,000	,835	,752	,800	,773	,457	,867	,722	,155
	N	63	63	32	63	47	48	48	48	48	48	47	40
COLFECAL	Correlação de Pearson	,240	,959**	1,000	1,000**	,099	-,004	-,18	,175	-,15	-,06	-,122	,229
	Sig. (bilateral)	,185	,000	,	,000	,653	,985	,393	,414	,490	,771	,578	,281
	N	32	32	32	32	23	24	24	24	24	24	23	24
ECOLI	Correlação de Pearson	,015	,967**	1,000**	1,000	,014	-,051	-,11	,046	-,09	,047	-,085	,171
	Sig. (bilateral)	,904	,000	,000	,	,923	,728	,465	,758	,546	,749	,570	,292
	N	63	63	32	63	47	48	48	48	48	48	47	40
A1	Correlação de Pearson	,138	,031	,099	,014	1,0	,736**	,100	,113	-,01	,015	,721**	,128
	Sig. (bilateral)	,354	,835	,653	,923	,	,000	,505	,449	,948	,921	,000	,485
	N	47	47	23	47	47	47	47	47	47	47	46	32
A2	Correlação de Pearson	,016	-,047	-,004	-,051	,736**	1,0	,006	-,11	-,07	-,08	,909**	,130
	Sig. (bilateral)	,912	,752	,985	,728	,000	,	,968	,449	,619	,570	,000	,478
	N	48	48	24	48	47	48	48	48	48	48	47	32
A3	Correlação de Pearson	,173	-,038	-,183	-,108	,100	,006	1,0	,633**	,122	-,11	,420**	,497**
	Sig. (bilateral)	,238	,800	,393	,465	,505	,968	,	,000	,408	,450	,003	,004
	N	48	48	24	48	47	48	48	48	48	48	47	32
FP	Correlação de Pearson	,293*	,043	,175	,046	,113	-,112	,633**	1,0	,624**	,364*	,186	,435*
	Sig. (bilateral)	,043	,773	,414	,758	,449	,449	,000	,	,000	,011	,211	,013
	N	48	48	24	48	47	48	48	48	48	48	47	32
PP	Correlação de Pearson	,209	-,110	-,148	-,089	-,01	-,074	,122	,624**	1,0	,582**	,006	,253
	Sig. (bilateral)	,154	,457	,490	,546	,948	,619	,408	,000	,	,000	,967	,162
	N	48	48	24	48	47	48	48	48	48	48	47	32
R	Correlação de Pearson	,014	-,025	-,063	,047	,015	-,084	-,11	,364*	,582**	1,0	-,106	,093
	Sig. (bilateral)	,923	,867	,771	,749	,921	,570	,450	,011	,000	,	,477	,614
	N	48	48	24	48	47	48	48	48	48	48	47	32
NTOTPLA	Correlação de Pearson	,098	-,053	-,122	-,085	,721**	,909**	,420**	,186	,006	-,11	1,000	,325
	Sig. (bilateral)	,513	,722	,578	,570	,000	,000	,003	,211	,967	,477	,	,075
	N	47	47	23	47	46	47	47	47	47	47	47	31
PLUVTOT	Correlação de Pearson	,270	,229	,229	,171	,128	,130	,497**	,435*	,253	,093	,325	1,000
	Sig. (bilateral)	,092	,155	,281	,292	,485	,478	,004	,013	,162	,614	,075	,
	N	40	40	24	40	32	32	32	32	32	32	31	40

* · Correlação é significativa em nível de 0,01 (bilateral).

** · Correlação é significativa em nível de 0,05 (bilateral).