

MONITORAMENTO DO IMPACTO DE DEJETOS INDUSTRIAIS EM AMOSTRAS  
DE ÁGUA DO RIO CAÍ ATRAVÉS DO TESTE SMART EM  
*Drosophila melanogaster*

Viviane Souza do Amaral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a  
obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade

Porto Alegre

2001

A uma grande guerreira:  
minha mãe

## O Sal da Terra

*Anda, quero te dizer nenhum segredo, falo nesse chão da nossa casa, vem que tá na hora de arrumar*

*Tempo, quero viver mais 200 anos, quero não ferir meu semelhante, nem por isso quero me ferir*

*Vamos precisar de todo mundo, para banir do mundo a opressão, para construir a vida nova vamos precisar de muito amor, a felicidade mora ao lado, e quem não é tolo pode ver*

*A paz na Terra*

*O pé na Terra*

*O Sal da Terra*

*Terra, és o mais bonito dos planetas, estão te maltratando por dinheiro, tu que és a nave nossa irmã*

*Canta, leva a tua vida em harmonia e nos alimenta com seus frutos, tu que és pro homem a maçã*

*Vamos precisar de todo mundo, um mais um é sempre mais que dois*

*Pra melhor juntar as nossas forças é só repartir melhor o pão*

*Recriar o paraíso agora, para merecer o que vem depois*

*Deixa nascer o amor*

*Deixa fluir o amor*

*Deixa crescer o amor*

*Deixa viver o amor*

*O Sal da Terra*

*Beto Guedes/Ronaldo Bastos*

## **AGRADECIMENTOS**

A Dra. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade, pelo exemplo de dignidade, profissionalismo e vida. Tu és um modelo a ser seguido. Obrigado pela tua confiança e amizade. Conte sempre comigo!

À Biba, pelo auxílio inestimável em várias etapas durante o desenvolvimento deste trabalho, como também pelo seu carinho e amizade.

À grande amiga, Marialva Sinigaglia (Meg), por nunca poupar tempo, atenção e apoio quando eu mais precisei.

Aos profissionais da SESMA/COPEL, pelo auxílio inestimável na realização deste trabalho.

Ao Elmo J. A Cardoso, pela paciência, disponibilidade e amizade ao longo de todo o curso de pós-graduação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos amigos, Marialva Sinigaglia, Maurício Lehmann e Knulp Vilar pela imprescindível ajuda na parte final deste trabalho.

À equipe do laboratório de Mutagênese, Aline Franco, Graciela Tybusch, Knulp Vilar, Maurício Lehmann e Marialva Sinigaglia, Mariana Hoff, pelo privilégio de tê-los não só como colegas, mas principalmente como amigos.

Aos colegas do Laboratório de Drosophila e de Imunogenética.

Aos meus AMIGOS, Ana Cristina Lauer Garcia, Cibele Masotti, Cibele Sippel, Jaqueline Batillana, Kenya da Silva Cunha, Knulp Vilar, Maria Cristina Munerato, Marcelle Pagot, Marialva Sinigaglia, Maurício Lehmann, Rafael Diehl, Renata Medina da Silva, Rodrigo Giorgis e Taís Frizzo, pela amizade, compreensão e pelos momentos de pura diversão...

E, especialmente, agradeço a minha mãe, que é a fonte de todo o meu ser. Eu te amo!

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio técnico do corpo de profissionais da Unidade de Segurança, Saúde e Meio Ambiente (SESMA) da Companhia Petroquímica do Sul (COPEL), subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelas Pró-Reitorias de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/PROPG--UFRGS).

# SUMÁRIO

---

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 Influência Industrial.....	12
1.2 Pólo Petroquímico do Sul.....	22
1.3 Rio Caí.....	25
1.4 O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	29
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. Pontos de Coleta.....	37
3.2. Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	40
3.3. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART).....	41
3.3.1. Linhagens Utilizadas.....	41
3.3.2. Cruzamentos.....	41
3.3.3. Tratamentos.....	42
3.3.4. Montagem das Lâminas.....	43
3.3.5. Análise Microscópica .....	43
3.4. Bases Genéticas.....	44
3.5. Análise Estatística.....	45
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1. Controles.....	48
4.2. Avaliação da Genotoxicidade.....	49
4.3. Parâmetros Físico-Químicos.....	53
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>64</b>

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivos (i) avaliar a validade do emprego do teste SMART, em *Drosophila melanogaster*, como indicador da contaminação de amostras de água superficial associada a misturas complexas, (ii) detectar a atividade tóxico-genética de dejetos industriais, lançados no rio Cai, empregando o cruzamento aprimorado. Dentro desta perspectiva, pretendeu também (iii) comparar os dados obtidos para as amostras sob influência de despejos industriais com aqueles previamente observados para amostras sob influência de dejetos de origem urbana, provenientes das cidades de Montenegro e São Sebastião do Cai (Silva., 1999).

Na tentativa de avaliar a genotoxicidade, associada ao curso final do rio Cai, foram selecionados os seguintes pontos de coleta de despejos industriais: Km 18,6 - situado na foz do arroio Bom Jardim, próximo à área de disposição do efluente final líquido e da drenagem das áreas de disposição dos resíduos sólidos do complexo industrial - e Km 13,6 - no canal da bacia de acumulação e segurança 7 do pólo industrial. Neste ensaio genético, cada amostra industrial foi administrada às larvas de terceiro estágio em duas diluições (25% e 50%), bem como na sua forma crua (100%) - sendo avaliados um total de 40 indivíduos por amostra por concentração, totalizando a análise de 11.712.000 células por amostra. Foram utilizados dois controles negativos, o controle de campo - representado pela nascente de um riacho localizada em uma área conservada com fraca ação antrópica e próxima aos pontos do rio - assim como o diluente água destilada.

Uma vez que as freqüências das diferentes categorias de manchas não foram significativamente superiores àquelas observadas nos controles negativos (água



destilada), os pontos Km 18,6 e Km 13,6 foram caracterizados como destituídos de ação genotóxica nos três meses de coleta : março, junho e setembro. Estes achados sugerem que, nas condições experimentais empregadas, os dejetos de origem industrial não foram capazes de induzir lesões do tipo mutação gênica, cromossômica, assim como eventos relacionados com recombinação mitótica. Por outro lado, a comparação dos dados obtidos no presente estudo com os observados por Silva (1999) para dejetos urbanos, revelou a validade do emprego do teste SMART como uma ferramenta para detecção de contaminação ambiental. De fato, as amostras urbanas referentes aos meses de março (Km 52, 78 e 80) e setembro (Km 52) – coletadas concomitantemente com as de origem industrial – foram diagnosticadas como indutoras de aneuploidias e/ou de grandes deleções cromossômicas. As potências genotóxicas médias estimadas mostraram que o Km 80 foi o local com o maior grau de genotoxicidade – seguido pelos Km 78 e 52 – que apresentaram potências semelhantes.

Considerando os resultados obtidos, em cinco pontos situados ao longo do curso final do rio Caí, conclui-se que os prejuízos causados pelos dejetos urbanos podem ser tão ou mais nocivos que os impostos pelos de origem industrial – especialmente em função de seu grande volume de lançamento.

## ABSTRACT

The objectives of the present study were (i) to evaluate the sensibility of the SMART test in *Drosophila melanogaster* as a monitor system of surface-water contaminations associated to complex mixtures, (ii) to detect the genetic toxicity of industrial waste discharges in the Cai river – by using the high-bioactivation cross and (iii) to compare the data obtained from the water samples subjected to the influence of industrial wastes with those observed for samples under the influence of untreated urban discharges from São Sebastião do Caí and Montenegro cities (Silva, 1999).

For the assessment of the genotoxicity in the lower course of Cai river water samples were collected in 2 industrial waste disposal sites: Km 18.6 – located in the mouth of Bom Jardim brook, which flows through the treated liquid industrial effluent disposal area and is also affected by solid waste disposal areas of the industrial complex drainage – and Km 13.6 – in the mouth of a channel that drains a safety and accumulation Basin (B7) from the industrial Pole. In the SMART assay each sample was administered to 3<sup>rd</sup> stage larvae in two dilutions (25% and 50%) as well as a crude sample (100%).

A total of 40 individuals/samples/concentration were evaluated, which means an overall 11.712.000 cell/sample analysed. Two negative controls were used: a field negative control – a creek spring situated in a protected area with almost no anthropogenic influence next to the river sites – and a laboratory negative control (distilled water).

Since no statistical difference was found for the frequencies of the different categories of spot, between the samples sites and their respective negative controls, sites Km 18.6 and Km 13.6 were characterized as destitute of genotoxic action in the three

collection months: March, June, and September. This means that, with the experimental conditions used, the industrial wastes induced neither point or chromosomal mutation, nor events related with mitotic recombination. On the other hand, the comparison between the data obtained in the present study with those observed by Silva (1999), concerning urban wastes, showed the value of the SMART assay as a tool for the detection of environmental contamination. In fact the urban samples - simultaneously collected with the industrial ones - were able to induce aneuploidies, as well as large chromosomal deletions. The estimated genotoxic potencies were higher for Km 80, followed by Km 78 e 52 - which have similar potencies.

Taking into account the results observed for five different sites located in the lower course of Cai river, the SMART assay results lead to the conclusion that urban wastes may be as polluting as or even more polluting than industrial ones - especially because they are discharged in large volumes.

# 1. INTRODUÇÃO

Ao longo das três últimas décadas, a comunidade científica e as agências de controle ambiental conscientizaram-se dos riscos que são impostos aos ecossistemas e à saúde humana, pela exposição, em longo prazo, a agentes contaminantes. Mudanças climáticas, diminuição da camada de ozônio, eutrofização das águas, assim como acidentes químicos e radioativos foram alguns dos sinais de alerta que incentivaram o desenvolvimento de programas voltados para o monitoramento ambiental da toxicidade genética associada aos sistemas biológicos.

Outro aspecto a ser considerado, dentro do contexto da poluição ambiental, relaciona-se com a diminuição da biodiversidade e da variabilidade genética das populações naturais em função das atividades humanas associadas à urbanização, agricultura e indústria. Embora diversos fatores estejam envolvidos na perda da diversidade genética, a contaminação química do ambiente - incluindo exposições crônicas das populações ou efeitos imediatos e agudos, como derramamentos de óleo - está estreitamente ligada ao declínio ou ao desaparecimento de muitas populações (Bickham, *et al.*, 2000).

De fato, em nível molecular, os agentes mutagênicos interagem com o DNA das células somáticas, causando lesões que podem alterar as células ou os tecidos, contribuindo de maneira significativa para o aparecimento de uma série de doenças genéticas (Bridges *et al.*, 1990; Karsten e Krypsin-Sorensen, 1988; Kirkwood, 1989; Fearon e Vogelstein, 1990). Desta forma, mutações e/ou alterações genômicas somáticas acabam por interferir sobre a variabilidade genética das populações, por alterarem parâmetros relacionados tanto com o sucesso reprodutivo, como com a taxa de

mortalidade das espécies. Podem também promover mudanças nas frequências alélicas não apenas por seleção de um loco que confere resistência a ambientes poluídos, mas também pela fixação, em pequenas populações, de alelos deletérios. A exemplo do que acontece com as células somáticas, também as germinativas sofrem os mesmos tipos de alterações genéticas, que interferem igualmente sobre o sucesso reprodutivo e o declínio da população e que culminam por atuar sobre o processo evolutivo. Desta forma, os poluentes ambientais induzem efeitos tóxicos, em nível molecular, ao mesmo tempo em que desencadeiam uma cascata de respostas, que inclui alterações: em células e tecidos somáticos – associadas a doenças genéticas – nas frequências alélicas, no sucesso reprodutivo e no tamanho populacional – relacionadas tanto com mutações somáticas quanto germinativas. Este conjunto de respostas à contaminação ambiental pode, finalmente, interferir sobre o processo evolutivo, levando, em casos extremos, a extinção das populações (Figura 1) (Bickham *et. al.*, 2000).

### 1.1. Influência Industrial

O lançamento de efluentes industriais nos corpos hídricos impõe um significativo risco aos ecossistemas, não apenas pelo volume de descarga dos dejetos, mas principalmente pela sua composição química. Esta situação agrava-se no momento em que são lançados resíduos contendo diferentes toxinas, que interagem entre si formando misturas complexas com características específicas – uma vez que estas interações podem aumentar sinergisticamente o potencial genotóxico (Vargas *et al.*, 2001). Em razão da natureza complexa destas misturas, diferentes bioensaios *in vitro*, *in vivo* e *in situ* - que detectam mutações gênicas, mutações cromossômicas e

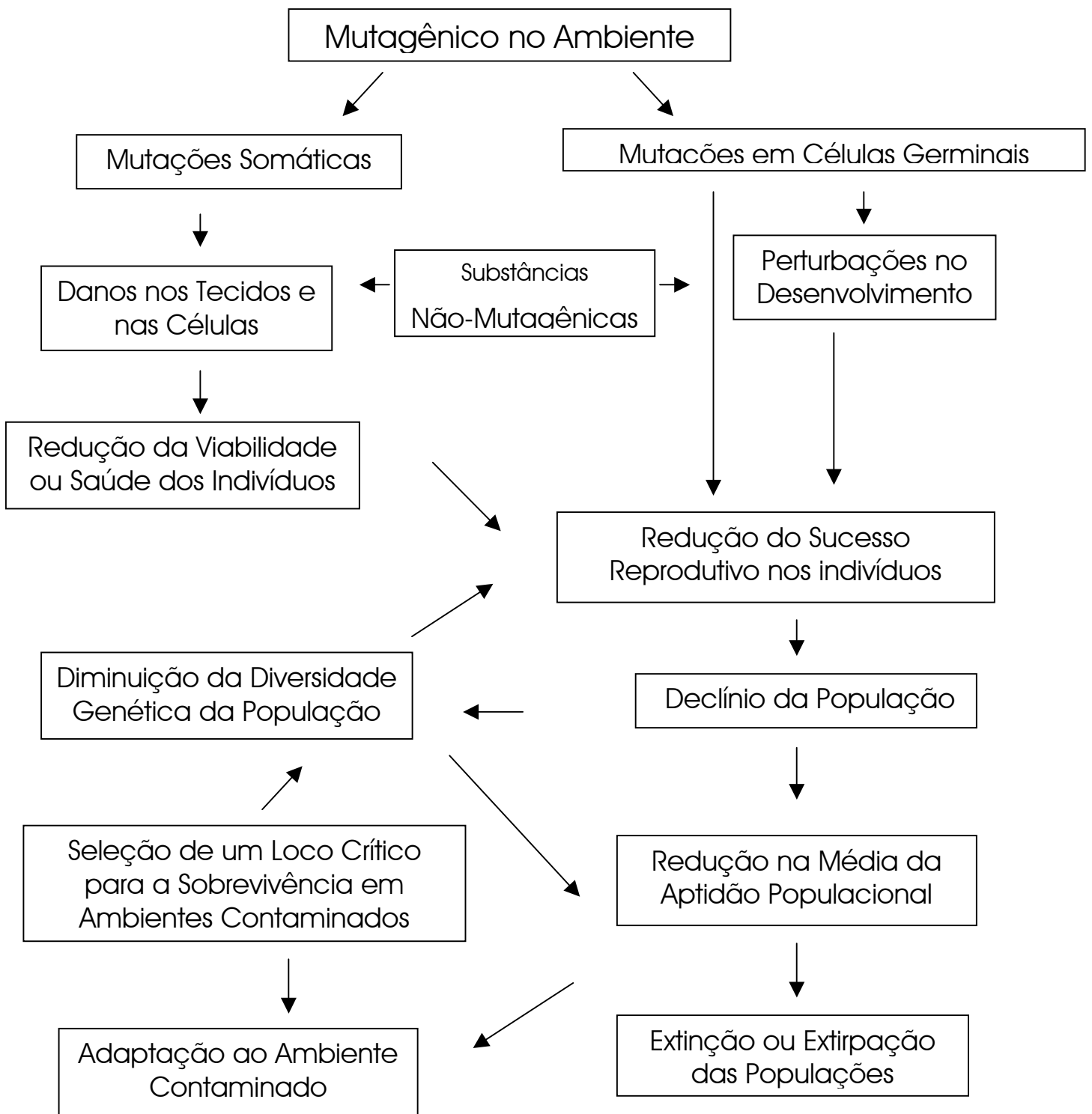


Fig. 1 Modelo que ilustra as inter-relações entre contaminantes químicos do ambiente com a diminuição da diversidade genética das populações. Este modelo detalha como um poluente, mutagênico e não mutagênico, afeta o sucesso reprodutivo dos indivíduos através de danos nas células somáticas e germinativas, que podem ocasionar um decréscimo na diversidade da população e, em condições extremas, a extinção da população (Bickham *et al.*, 2000).

recombinação mitótica, assim como reparo induzido por danos no DNA - vem sendo utilizados como ferramentas para o monitoramento do risco imposto pelos dejetos industriais, permitindo um diagnóstico mais amplo da qualidade dos corpos d'água associados a estes despejos (Houk, 1992).

Dentre os ensaios mais empregados para a avaliação da genotoxicidade associada a dejetos de origem industrial destaca-se o teste de Ames em *Salmonella typhimurium* (McGeorge *et al.*, 1985; Houk, 1992; Vargas *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2001). A utilização deste bioensaio, em diferentes abordagens experimentais, evidenciou que despejos oriundos de diferentes tipos de indústrias apresentam um espectro de resposta mutagênica variável, dependente do tipo de produto processado. Quando se consideram todos os tipos de efluentes industriais avaliados, as potências mutagênicas distribuem-se dentro do intervalo compreendido entre  $10^2$  a  $10^{12}$  revertentes por litro de amostra. De fato, dejetos que induzem valores iguais ou superiores a  $10^{12}$  revertentes por litro impõem um grave risco aos ecossistemas. Entretanto, os incluídos no extremo inferior do espectro ( $10^2$  revertentes/l), são considerados como tendo um baixo risco como indutores de mutações gênicas. Ao mesmo tempo, a associação entre potência mutagênica e composição dos efluentes originados por cada indústria revela que as empresas responsáveis pela produção de furazolidona e nitrofurfural são as que contribuem com os maiores índices de potência mutagênica, seguidas das refinarias de petróleo, indústrias de forja, de produção de compostos orgânicos e de resíduos gerados por fornalhas de coque (Figura 2).

Outro ponto relevante a ser considerado relaciona-se com a avaliação da toxicidade genética associada a diferentes categorias de efluentes industriais – onde são incluídas indústrias de corantes, resinas, compostos orgânicos e petróleo. De fato, observou-se que as empresas produtoras de corantes e de compostos orgânicos – a

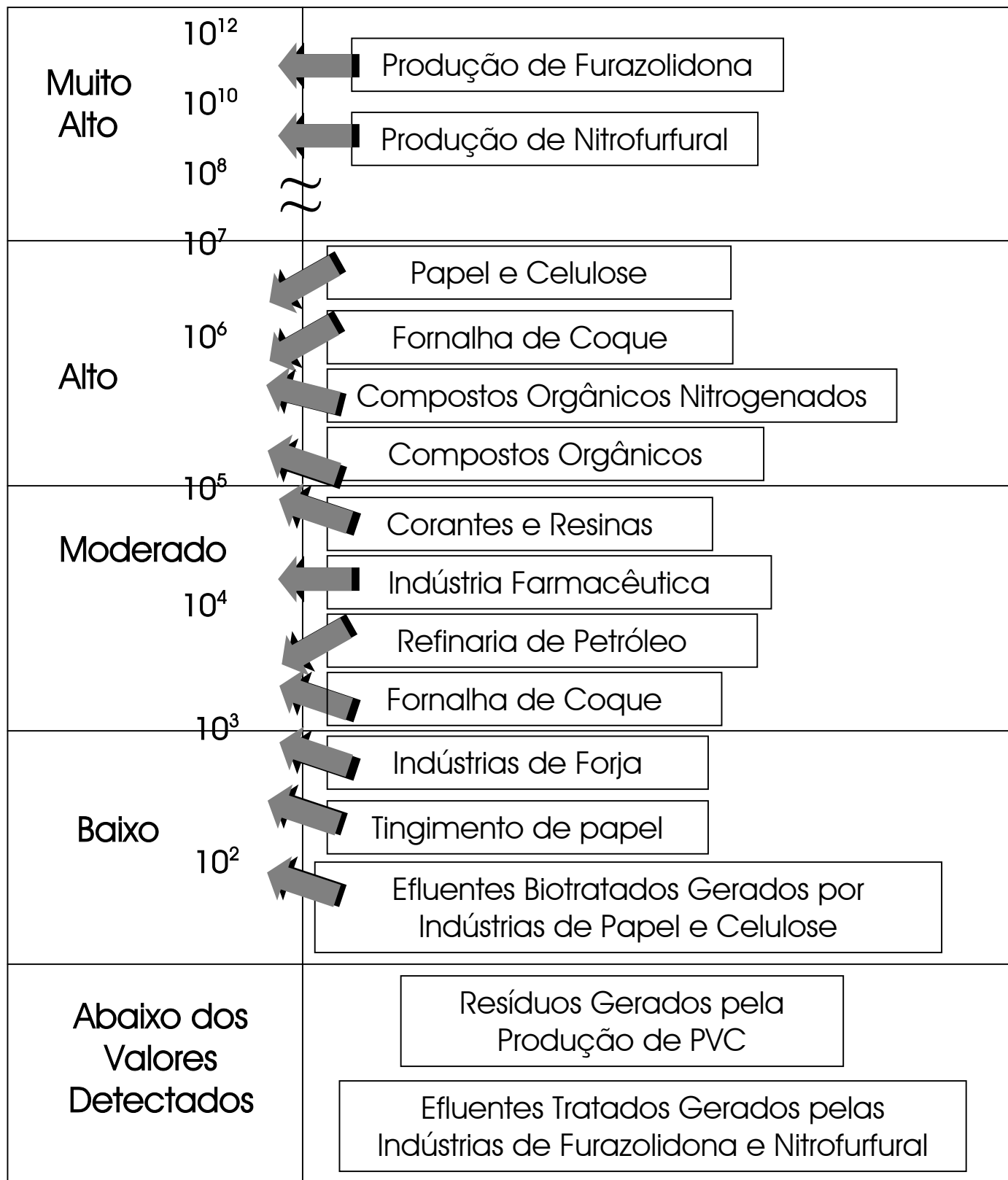


Figura 2: Potências mutagênicas obtidas pelo Teste de Ames (revertentes por litro de efluente), de acordo com Claxton *et al.*, 1998, baseado em Houk, 1992.



despeito de estarem incluídas na categoria moderadamente mutagênica - são as principais responsáveis pela emissão de efluentes genotóxicos, contribuindo com, respectivamente, 84% e 72% das respostas positivas obtidas através do teste de Ames (McGeorge *et al.*, 1985; Claxton *et al.*, 1998) (Gráfico 1). Este bioensaio também foi utilizado para investigar o potencial genotóxico do lago Taihu (China), que recebe constantes descargas de dejetos industriais. Dos quatro pontos analisados, três apresentaram resposta positiva na cepa TA98, em presença ou ausência da fração S9. Uma vez que a análise dos dados obtidos com a cepa TA100 não foram estatisticamente significantes, os autores concluíram que a toxicidade genética observada está predominantemente associada a mutações pontuais por deslocamento no módulo de leitura. Embasamento para esta premissa foi fornecido pelos dados obtidos no teste Ara (Arabinose Resistance Test), utilizando estas mesmas amostras (Shen *et al.*, 2001).

Este padrão de resposta não parece estar restrito a um único tipo de bioensaio, uma vez que a avaliação da genotoxicidade de 42 efluentes de uma série de indústrias não afins, evidenciou que as empresas produtoras de corantes e compostos orgânicos foram as que mais contribuíram para a genotoxicidade associada à indução de reparo indutor de erro, evidenciada pelo Cromoteste SOS (White *et al.*, 1996; Claxton *et al.*, 1998).

É também importante enfatizar que, a despeito da ampla distribuição do espectro mutagênico de diferentes indústrias, efluentes de empresas que produzem produtos afins induzem valores de potência mutagênica que diferem em apenas uma ordem de magnitude o que, na maioria das vezes, pode ser atribuído a uma classe específica de composto químico (Houk, 1992; Claxton *et al.*, 1998).

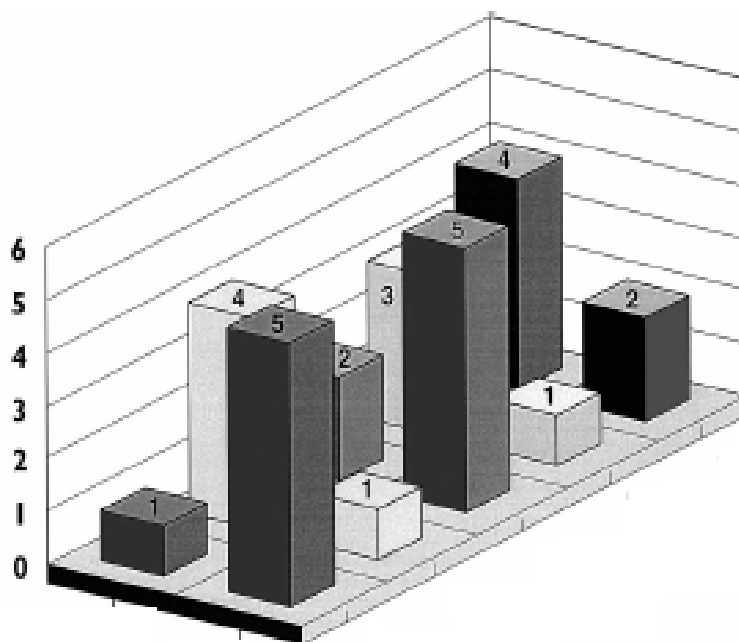


Gráfico 1: Número de pontos de coleta para cada tipo de efluente, evidenciando resposta mutagênica positiva ou negativa no Teste de Ames, de acordo com Claxton *et al.*, 1998, baseado nos dados de McGeorge *et al.*, 1985.

Adicionalmente, testes especialmente delineados para a detecção de eventos associados com perda de cromossomos inteiros ou deleções de fragmentos cromossômicos, foram aplicados para a avaliação da ação genotóxica de amostras de corpos d'água sob a influência de despejos industriais. De fato, independente do tipo de organismo experimental empregado, *Allium cepa*, *Rana clamitan* ou *Bufo americanus* - os efluentes provenientes das indústrias químicas, metalúrgicas, petroquímicas, têxteis e de celulose induziram aumentos significativos nas frequências de eventos associados à clastogênese e à aneugênese (Nielsen e Rank, 1994; Ralph e Petras, 1998).

Um parâmetro adicional, que detecta a indução de trocas entre cromátides-irmãs (SCE), foi incluído na avaliação de áreas que estão sob impacto de dejetos industriais. Amostras de água do rio Salzach (Áustria) - que recebem efluentes de indústrias petroquímicas, de papel e de alumínio - foram avaliadas, através dos testes de micronúcleos e de aberrações cromossômicas em metáfase, utilizando cultura de células de hepatócito de rato. Os dados obtidos revelaram que a toxicidade genética das amostras distribui-se dentro de uma curva de dose-resposta, dependente do tipo de ensaio empregado. Desta forma, foram observadas respostas positivas quanto à indução de SCE nas concentrações de 0,1%, 1% e 100%, enquanto que os incrementos nas frequências de micronúcleos e de aberrações cromossômicas foram estatisticamente significantes somente na concentração mais alta (100%). A comparação entre os dados obtidos através destes bioensaios mostrou que o teste para detecção de SCEs é o melhor indicador da genotoxicidade de dejetos de origem industrial, seguido pelo de micronúcleos e de aberrações cromossômicas, que mostraram uma sensibilidade similar. O conjunto destas observações enfatiza a importância de que sejam avaliados diferentes parâmetros genéticos, para que possa

ser traçado um quadro completo sobre a toxicidade genética, já que as respostas obtidas estão diretamente vinculadas à composição química das amostras ambientais sob a influência de despejos industriais (Eckl, 1995).

Com o objetivo de estimar o risco genético imposto ao ambiente pelos poluentes industriais, diversos sistemas de detecção de genotoxicidade, baseados na resposta de vegetais, estão sendo empregados para a avaliação de misturas complexas - incluindo o teste de micronúcleos (MCN) e o ensaio de aberração cromossômica em ponta de raiz de *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Tradescantia paludosa* (Duan *et al.*, 1999a). A principal vantagem, em comparação com os testes citogenéticos em culturas de células de mamíferos e os ensaios de mutagenicidade em bactérias, reside no fato de que as plantas podem ser expostas diretamente às amostras, sem envolver qualquer processo de filtração ou de concentração (Steinkellner *et al.*, 1999).

O ensaio de micronúcleos em *Vicia faba* foi utilizado para determinar a genotoxicidade de amostras de água coletadas nos rios Kui e Xiaoqing (China). Os resultados revelam a genotoxicidade inerente a todos os pontos de coleta. O grau de poluição encontrado, nos diferentes pontos ao longo do rio Kui, está associado com os dejetos de diferentes tipos de indústrias. Entretanto, a amostra que induziu um maior aumento na frequência de micronúcleos está localizada próxima à descarga de uma indústria de plásticos (Ji *et al.*, 1999). Em relação ao rio Xiaoqing, as amostras induziram fortes respostas positivas – inclusive na concentração mais baixa (25%) - o que aponta para altos índices de poluição ambiental. As principais fontes de contaminação associadas a este rio são provenientes das indústrias de compostos químicos, couro, papel e corantes (Miao *et al.*, 1999). Esta mesma metodologia evidenciou a toxicidade genética de 12 pontos costeiros, distribuídos ao longo do lago Dianchi (China), que

recebe lançamento de efluentes industriais. Ainda que tenha sido demonstrado que estes efluentes induzem eventos genotóxicos, as amostras coletadas na estação de seca mostraram uma maior potência do que as coletadas durante a estação chuvosa, em função da maior concentração de toxinas presentes no período de escassez de chuvas (Duan *et al.*, 1999a).

Através do bioensaio de micronúcleos em *Tradescantia*, foi possível determinar os níveis de poluição de três rios que passam pela cidade de Fuzhou na China. Todas as amostras de água analisadas induziram níveis significativos de micronúcleos, quando testadas na sua forma não diluída. Entretanto, os rios apresentaram graus de contaminação diferentes. A origem da poluição é atribuída, principalmente, a presença de indústrias que lançam seus rejeitos diretamente nos rios (Zeng *et al.*, 1999). Este mesmo ensaio foi utilizado para avaliar amostras provenientes dos dois principais rios da Áustria – Danúbio e Salzach - demonstrando a ausência de substâncias com potencial clastogênico nestas amostras, que estão sob influência de despejos industriais (Steinkellner *et al.*, 1999).

O teste para verificação de mutação nos pêlos estaminais de *Tradescantia* (Trad-SHM), foi empregado, concomitantemente com o de micronúcleos (Trad-MCN) para avaliação da genotoxicidade de amostras de água dos rios Panlong e Lijang (China). Em ambos os ensaios foi possível observar um aumento da resposta genotóxica, que se restringiu a dois pontos amostrais sob influência de despejos industriais. Além disto, através dos resultados obtidos com o Trad-MCN – que se mostrou mais sensível para a análise destas amostras – foi verificado um maior aumento na genotoxicidade nos pontos a jusante, em relação aos localizados a montante no rio Panlong, em função do crescente acúmulo de poluentes gerados pelas descargas industriais lançados no seu curso (Duan *et al.*, 1999b; Jiang *et al.*, 1999).

O teste para indução lisogênica em *E. coli*, que possibilita a análise de uma variedade de danos genéticos, especialmente lesões originadas por quebras de DNA, revelou a toxicidade genética associada a 14 efluentes, oriundos de diferentes tipos de indústrias norte-americanas - petroquímica, farmacêutica e de plástico (Houk e DeMarini, 1988). Dentro deste mesmo enfoque, foi avaliada a genotoxicidade de amostras de água superficial e intersticial, assim como de sedimentos do rio dos Sinos (RS, Brasil) - através do método direto ou de fracionamento - que estão sob a influência direta de descargas de indústrias metalúrgicas, químicas, têxteis, de alimentos, couro e calçados. As respostas obtidas evidenciaram a presença ou o indicativo de genotoxicidade, pelo menos em uma amostra de cada sítio analisado - que foi atribuída a metais pesados e a compostos orgânicos, presentes nas frações polares e não-polares (Vargas *et al.*, 2001).

Ainda utilizando o sistema de fracionamento, foi avaliado o potencial genotóxico de cinco frações, quimicamente caracterizadas, de uma série de efluentes de origem industrial, que são lançados na água do rio Labe (República Tcheca). Estas amostras foram testadas através do teste de Ames, visando analisar o seu potencial como indutoras de mutações gênicas. Observou-se que as frações polares - básicas e ácidas - causaram acréscimos significantes nas frequências de mutações pontuais, distribuídas dentro de uma curva de dose-resposta. Entretanto, quando se consideram os efluentes finais, não fracionados, são obtidos valores de potência mutagênica superiores àqueles encontrados para as amostras fracionadas. Assim, pode-se inferir que as substâncias presentes nas amostras cruas interagem entre si, exercendo um efeito sinérgico - e, portanto, o sistema de fracionamento não reflete o real impacto causado pelos mutagênicos sobre os ecossistemas. Porém, as frações, assim como as amostras cruas, não induziram aumentos significativos nas frequências de mutações do tipo quebra,

cromossômicas ou cromatídicas, evidenciando que a toxicidade genética inerente a estas amostras relaciona-se, basicamente, com a presença de substâncias com potencial mutagênico (Černá *et al.*, 1996).

Respostas semelhantes quanto à genotoxicidade de frações líquidas e frações associadas à matéria particulada - de 50 efluentes industriais, provenientes de 42 diferentes linhas de produção - foram obtidas através do Cromoteste SOS. Aproximadamente 48% dos extratos testados induziram a função SOS, havendo uma diminuição no número de respostas positivas com a adição da fração S9. Além disto, a maior contribuição para a resposta genotóxica observada foi relacionada às partículas em suspensão, que mostraram ser quatro vezes mais potentes do que as frações líquidas. Os dados sugerem que as indústrias de papel e celulose lançam uma grande quantidade de genotoxinas solúveis, enquanto que as refinarias de petróleo e de alumínio liberam, predominantemente, substâncias genotóxicas associadas às partículas em suspensão (White *et al.*, 1996).

## 1.2. Pólo Petroquímico do Sul

Uma área verde de 3.600 hectares no município de Triunfo, a 52 quilômetros de Porto Alegre, abriga o Pólo Petroquímico do Sul. Implantado no início dos anos 80, opera a central de matérias-primas e oito indústrias de segunda geração. Este complexo industrial produz cerca de 40% do eteno consumido no Brasil, com capacidade de produção de 1.135.000 toneladas por ano. Além do eteno, a empresa produz propeno, butadieno, benzeno, tolueno, xilenos, o que perfaz uma produção de cerca de 3 milhões de toneladas anuais de produtos petroquímicos. As empresas que constituem este complexo mantêm programas próprios de gestão dos rejeitos industriais, visando à

manutenção dos ecossistemas associados ao Pólo Petroquímico. Os efluentes líquidos e os resíduos sólidos, depois de tratados internamente, são enviados para unidades centralizadas de tratamento adicional e disposição (Copesul, 2001).

O Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos – SICECORS – é responsável pela coleta, tratamento e disposição dos dejetos sólidos gerados pelas indústrias do Pólo. Enquanto que os efluentes líquidos pré-tratados chegam ao Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) em duas correntes: orgânica e inorgânica, os dejetos orgânicos necessitam de tratamento mais complexo, passando tanto por etapas físico-químicas quanto por procedimentos biológicos – que incluem três tipos diferenciados de tratamentos, designados como primário, secundário e terciário (Figura 3) (Copesul, 2001).

No tratamento primário são eliminados, inicialmente, materiais grosseiros e flutuantes, através de gradeamento e, em seguida, são separados os óleos e a areia. Em um segundo momento, os efluentes são encaminhados à bacia de equalização, com o objetivo de amortecer as variações de fluxo decorrentes do regime de trabalho das indústrias, homogeneizando os despejos e reduzindo possíveis diferenças na sua constituição. Após esta etapa, a matéria orgânica é eliminada através do tratamento biológico secundário, denominado “lodo ativado”. Neste processo, a matéria orgânica, suspensa em líquido, serve como meio de cultura para o crescimento de microorganismos – que a utilizam como alimento. Em seguida o líquido, em princípio livre de componentes orgânicos, passa para os decantadores, sendo clarificado pela ação da gravidade. Finalmente, é encaminhado para o tratamento terciário – que inclui um conjunto de oito lagoas de estabilização, dispostas em série, com tempo de contenção de oitenta dias (Copesul, 2001).



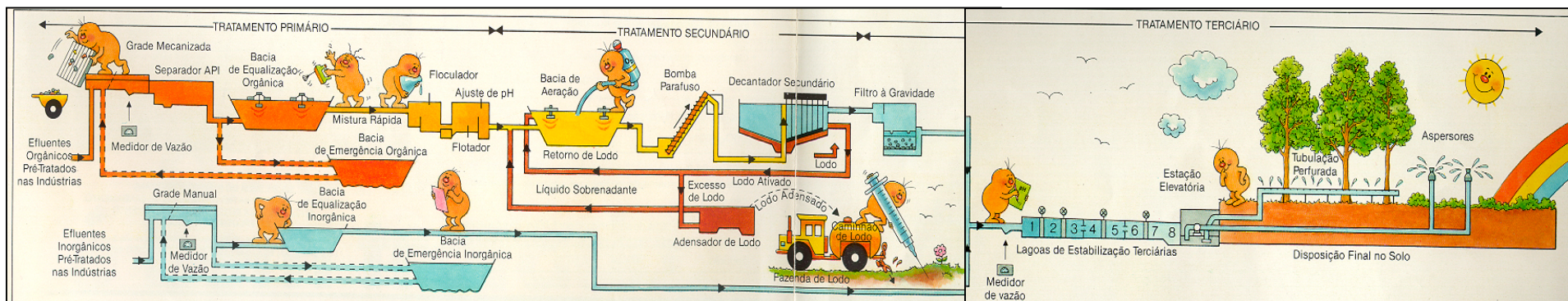


Figura 3: Representação Esquemática do Tratamento de Efluentes do Pólo Petroquímico do Sul.

O tratamento do efluente inorgânico consiste, basicamente, de uma bacia de equalização, com capacidade para 10.300 m<sup>3</sup>, que recebe o efluente inorgânico proveniente das indústrias. Após este processo, o despejo é bombeado, em conjunto com o efluente orgânico tratado, para as lagoas de estabilização onde atinge a qualidade requerida pelos padrões de proteção ambiental. O efluente final resultante é disposto sobre o solo através de aspersores e tubulações perfuradas, de forma controlada, favorecendo a ação dos processos naturais, o que diminui a quantidade de líquidos a penetrar no solo e evita a contaminação do lençol freático (Figura 3) (Copesul, 2001).

Porém, mesmo com esta gama de tratamentos dos dejetos industriais, há a possibilidade de que alguma fração dos componentes tóxicos seja liberada para o ambiente. Por essa razão, a qualidade das águas superficiais da região é monitorada através de programas de amostragem e análise, realizados no Rio Caí, no Arroio Bom Jardim, nas bacias de acumulação e segurança, no Terminal Santa Clara e nos lotes de disposição de cinzas. As águas subterrâneas são avaliadas semestralmente, através da análise de amostras, coletadas em mais de 100 poços, que captam água do lençol freático a uma profundidade média de 10 metros. Estas análises incluem parâmetros físico-químicos, biológicos, tóxicos e mutagênicos (Copesul, 2001).

### 1.3. Rio Caí

Situado no Estado do Rio Grande do Sul, e integrante da Bacia do Guaíba, o rio Caí percorre uma área de 5.057,25 Km<sup>2</sup>, o que corresponde à cerca de 1,8% do território rio-grandense. Ao longo do seu curso estão situados 41 municípios, habitados

por aproximadamente 385.000 pessoas, que representam 4% da população total do Estado. Percorre áreas que estão sob influência tanto de centros urbanos, como de atividades associadas à agricultura, pecuária e indústria. Os ramos mais representativos do setor industrial da região são o metal-mecânico, coureiro-calçadista, assim como as indústrias alimentícias que incluem frigoríficos, abatedouros, fábricas de bebidas e conservas. As indústrias de matérias plásticas e de artigos têxteis concentram-se, nos municípios de Triunfo (onde situa-se o Pólo Petroquímico) e de Caxias do Sul. Estima-se que, ao longo de todo o curso do rio Caí – superior, médio e inferior - a vazão de lançamento de dejetos, associados às atividades industriais, é de 31.640,81 m<sup>3</sup> por dia, perfazendo um total de 690.360,20 m<sup>3</sup> por mês (FEPAM/GTZ, 1997).

O curso inferior do rio Caí caracteriza-se, economicamente, pela pecuária e cultivo de arroz, assim como por indústrias de grande porte, como é o caso do Pólo Petroquímico. As cidades de Montenegro e de São Sebastião do Caí concentram atividades relacionadas, basicamente, com pequenas indústrias. Adicionalmente, nestes dois últimos municípios, os esgotos cloacais são ligados à rede de esgotos pluviais, sendo lançados diretamente nos cursos d'água a eles associados. Desta forma, este é o segmento do rio que mais recebe lançamentos de efluentes de pequenas e grandes indústrias e onde há maior despejo de esgotos domésticos não tratados. Em função desta ampla gama de despejos industriais e urbanos, o controle da qualidade das águas do rio Caí tem sido assunto de grande preocupação por parte tanto das comunidades locais quanto das empresas da região (FEPAM/GTZ, 1997).

O rio Caí vem sendo alvo de uma série de estudos que procuram identificar a presença de substâncias genotóxicas, especialmente no seu curso final, em função da influência exercida pelo Pólo Petroquímico do Sul. O primeiro, realizado em 1983, avaliou uma série de pontos de amostragem dentro do complexo industrial - bacias de

acumulação e segurança, efluentes industriais, áreas de extravasamento de águas do parque industrial, bem como os arroios Canal Sul, Norte e o arroio Bom Jardim. Utilizando o teste *Salmonella*/microsoma, como método de triagem, foram obtidas respostas positivas na maioria dos sítios de coleta, evidenciando a presença de substâncias mutagênicas na área de influência do Complexo Petroquímico (Vargas *et al.*, 1988). De posse destes dados, foram delineadas novas abordagens e metodologias, visando obter respostas mais completas e precisas sobre o impacto causado pela presença de agentes genotóxicos ao longo do curso do rio Caí.

Em adição ao teste de Ames, o ensaio de indução lisogênica e vários bioensaios em *Saccharomyces cerevisiae*, que detectam múltiplos eventos genéticos, foram empregados para obter informações mais abrangentes referentes ao impacto causado por despejos industriais. O teste *Salmonella*/microsoma evidenciou a ação mutagênica dos diferentes pontos amostrados, ao mesmo tempo que permitiu delimitar o espectro de respostas positivas, compreendido entre o ponto a montante até o local a jusante do parque industrial: Km 24,1 (6%), Km 18,6 (25%), Km 13,6 (42%), Km 13,3 (15%) e Km 10,6 (12%). Estes valores de potência mutagênica mostram que os locais de coleta Km 18,6, 13,6 e 13,3 são os que induzem uma maior mutagenicidade - estando localizados próximos às áreas de disposição do efluente líquido, bacias de acumulação e segurança da drenagem pluvial, assim como ao Canal Sul (Vargas, 1992). A análise realizada por Vargas *et al.*, (1988), nesta área interna do complexo, evidenciou que a contaminação está diretamente vinculada a substâncias que induzem substituição de pares de bases e/ou erro no quadro de leitura. O ensaio de microtriagem por indução lisogênica foi a segunda metodologia de avaliação genotóxica empregada. Nos testes realizados, em ausência de metabolização, a indução foi fracamente positiva (Km 10,6) ou positiva nos demais locais de amostragem, à exceção do ponto Km 18,6.

Quando foi empregado o sistema de metabolização exógena, o diagnóstico obtido foi negativo, evidenciando que as genotoxinas presentes são detoxificadas. Também foram estimadas as atividades mutagênica e recombinogênica destas amostras, em *Saccharomyces cerevisiae*, em fase estacionária e exponencial de crescimento. Na fase estacionária, observou-se acréscimo nas frequências de eventos relacionados com permuta (Km 24,1) e conversão gênica (Km 18,6 e 13,6). Entretanto, na fase exponencial, os resultados estatisticamente significantes restringiram-se apenas à indução de permuta mitótica no ponto Km 18,6. Segundo os autores, a variabilidade de resposta observada pode ser atribuída a variações fisiológicas e metabólicas, assim como à ação de mecanismos de reparação, que estariam ativos somente na fase exponencial de crescimento (Vargas, 1992; Vargas *et al.*, 1993).

Associadas a estas análises foram empregadas técnicas citogenéticas *in vitro* para a avaliação da indução de aberrações cromossômicas, utilizando o método de bloqueio da citocinese (CBMN), em cultura de linfócitos humanos. Esta metodologia foi empregada para a análise dos mesmos pontos anteriormente analisados por Vargas *et al.* (1988), tendo sido incluído o ponto Km 14,1. Os resultados obtidos revelaram a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico em todos os sítios de amostragem. A indução de micronúcleos foi mais freqüente no ponto Km 18,6 - localizado próximo à área de disposição do efluente industrial final líquido e da drenagem da área de disposição dos resíduos sólidos - com 44% do total de resultados positivos. Os demais sítios de coleta também apresentaram respostas positivas, embora com incrementos menos marcantes. Cerca de 28% do total de respostas está associado ao ponto Km 24,1, seguido do Km 13,6 (17%) e do Km 14,1 (11%) (Lemos e Erdtmann, 2000).

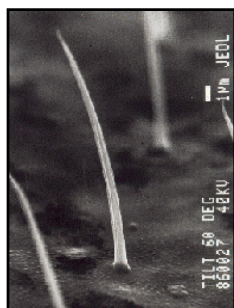
#### 1.4. O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*

A recente comparação dos dados obtidos através do Projeto Genoma Humano – com aqueles observados no programa equivalente desenvolvido com a *Drosophila melanogaster* – mostra a alta conservação de genes e funções bioquímicas entre estes dois organismos, representada por uma homologia genética de 80%. Embora a *Drosophila* apresente apenas ~13.000 genes, comparados aos ~30.000 de humanos, a maioria destes são duplicações e elaborações de seus equivalentes encontrados nesta mosca (Miklos e Rubin, 1996). Como consequência, existe uma alta conservação de rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; St. John e Xu, 1997). Adicionalmente, um número significativo de genes estudados na mosca da fruta provou ser homólogo de genes supressores de tumor e oncogenes humanos (Miklos e Rubin, 1996). Em função destas similaridades, a *Drosophila* é considerada como um excelente modelo para estudar a genotoxicidade e seus mecanismos moleculares, podendo fornecer respostas relevantes, que podem ser extrapoladas para humanos.

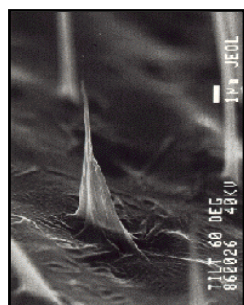
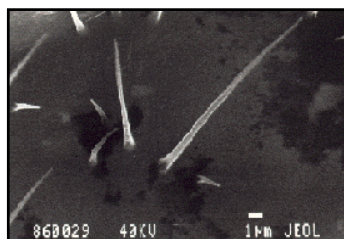
Na Genética Toxicológica, tem-se utilizado a *Drosophila melanogaster*, principalmente para a obtenção de resposta em células germinais, através dos testes para detecção de Letal Recessivo Ligado ao Sexo (SLRL) e para Perda do Cromossomo X em anel (RXL) – permitindo, respectivamente, o prognóstico de agentes mutagênicos e clastogênicos. Na última década, entretanto, o teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) tem-se destacado como um instrumento preciso para discriminar simultaneamente agentes mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos. A análise dos possíveis danos induzidos é feita pela observação de

grupos celulares (manchas) com fenótipo marcador específico (*mwh* e/ou *flr<sup>3</sup>*), que se manifestam visualmente na forma de tricomas mutantes (Figura 4). Estes fenótipos expressam-se devido à perda da heterozigose, induzida pelos diferentes tipos de eventos genotóxicos acima referidos. Enquanto o número de manchas ou clones mutantes fornece resultados quantitativos sobre os danos induzidos, os tipos de manchas dão informações sobre a natureza da lesão que as originou. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples - quando apenas um dos marcadores se expressa, *mwh* ou *flr<sup>3</sup>* - ou como gêmeas - quando tanto pêlos múltiplos (*mwh*), como pêlos com a base alargada (*flr<sup>3</sup>*) estão presentes dentro de um mesmo clone (Figura 5). As manchas simples indicam a ocorrência de mutação gênica e/ou cromossômica, bem como de eventos recombinogênicos. Por outro lado, as gêmeas são originadas exclusivamente por recombinação somática (Graf *et al.*, 1984). Também o tamanho dos clones pode nos fornecer informações, já que está correlacionado com o tempo de atuação da genotoxina ao longo da embriogênese e, desta forma, com o momento da indução do dano genético. Além disto, aumentos restritos a manchas simples pequenas podem ser indicativos de aneugênese ou de clastogênese, uma vez que células monossômicas ou portadoras de grandes deleções dividem-se de forma esporádica (Graf, 1995). Adicionalmente, a utilização deste bioensaio, permite a detecção de genotoxinas de ação direta, bem como daquelas que somente quando são metabolizadas, exercem sua atividade genotóxica (Frölich e Würigler, 1990; Graf e van Schaik, 1992; Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995).

A confirmação de que muitas substâncias que apresentam resposta negativa em ensaios que visam a detecção de atividade mutagênica e/ou clastogênicas são exclusivamente recombinogênicas (Graf *et al.*, 1984) - associada à obtenção de



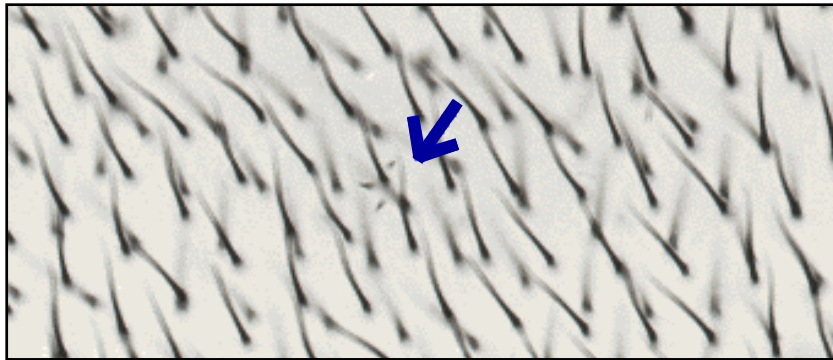
a) normal



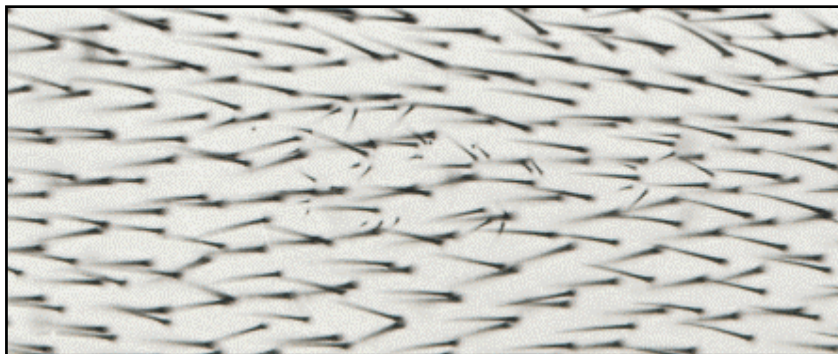
c) *flr*<sup>3</sup>

Figura 4. Tipos de tricomas analisados no bioensaio SMART de asa.

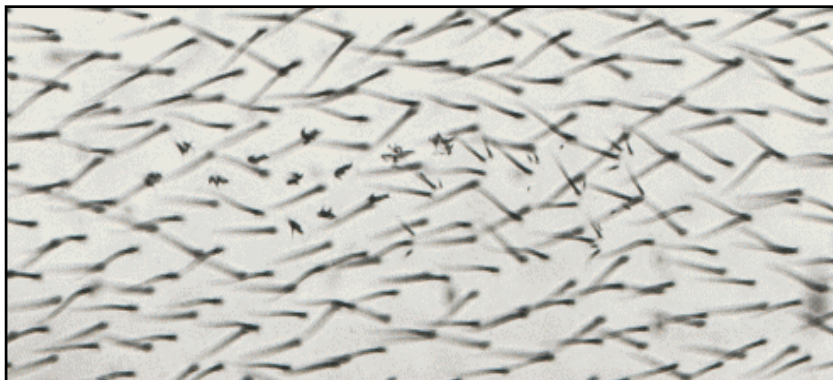




Mancha simples pequena



Mancha simples grande



Mancha gêmea

Figura 5. Manifestação fenotípica dos diferentes tipos de manchas observadas nas asas dos imagos de *Drosophila melanogaster*, oriundos do teste SMART.

resultado em curto prazo - justificam e validam o seu emprego em rotinas que visam cobrir os diferentes danos genéticos possíveis de serem induzidos no DNA das células somáticas. A maior justificativa para o emprego do teste SMART fundamenta-se no seu alto poder discriminatório no que tange, não apenas às mutações pontuais e cromossômicas, mas especialmente aos eventos recombinacionais – com possibilidade de quantificar a contribuição de cada um destes tipos de eventos para a genotoxicidade total das substâncias em estudo (Frei e Würzler, 1996; Torres *et al.*, 1998).

Ainda que a recombinação homóloga desempenhe um papel essencial na manutenção da integridade genômica, bem como na evolução dos genomas, ela também tem uma participação preponderante na ativação inapropriada de proto-oncogenes e na inativação de genes supressores tumorais. Este paradoxo, entre os efeitos benéficos e deletérios da recombinação, torna-se ainda maior quando se leva em conta que a recombinação não homóloga é capaz de gerar alterações que se expressam como inversões, translocações, deleções e duplicações. É, pois, esta força deletéria que coloca a recombinação somática na gênese de desordens genéticas, que incluem uma série de doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento, bem como com o desenvolvimento de tumores malignos (Hartley, 1996; St. John e Xu, 1997). Desta forma, torna-se premente a utilização de bioensaios delineados para a detecção deste evento, especialmente quando se comprova que a recombinação é a força que mais contribui para a indução do câncer – mais do que as mutações e aberrações cromossômicas.

Aproximadamente 400 compostos já foram analisados através do teste SMART de asa, sendo, na sua maioria, produtos puros. Da mesma forma, misturas complexas

também já foram testadas, dentre elas algumas bebidas – alcóolicas ou não – extratos de chás, diferentes tipos de cafés, vinhos e conhaque (van Schaik *et al.*, 1984; Graf e Würgler, 1986; Graf *et al.*, 1992). O teste SMART foi aplicado, concomitantemente com o teste de Ames, para investigar o potencial genotóxico de partículas em suspensão no ar (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1993, 1999). Os dados demonstraram a sensibilidade do teste SMART em relação à fração orgânica de amostras ambientais, uma vez que apresentaram uma boa correlação com os resultados obtidos através do teste de Ames (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1999).

Entretanto, o SMART tem sido ainda pouco empregado para o monitoramento da toxicidade genética de amostras ambientais. Conseqüentemente, sua adequação, como uma nova ferramenta para o diagnóstico da genotoxicidade associada aos ecossistemas, necessita ser ainda investigada.

## 2. OBJETIVOS

O rio Caí é utilizado como principal fonte de água e corpo hídrico recipiente de efluentes industriais e municipais. Diversas atividades recreativas – como a pesca artesanal – assim como atividades lucrativas – como o cultivo agrícola, a criação de gado, a extração de areia, e a crescente industrialização – vem sendo intensamente praticadas nas suas margens. Em função destas peculiaridades, a utilização de bioensaios capazes de detectar simultaneamente uma ampla gama de lesões, em nível gênico e cromossômico, poderá traçar um diagnóstico mais completo da toxicidade genética associada ao curso inferior do rio Caí. Dentro deste contexto, destaca-se o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART), que tem se mostrado uma ferramenta precisa para a detecção do impacto causado por diferentes poluentes aos ecossistemas. Considerando estas duas premissas, o presente trabalho foi delineado no sentido de atingir os seguintes objetivos:

- Avaliar, através do teste SMART de asa, amostras de água superficial de dois pontos do rio Caí (Km 18,6 e Km 13,6) que estão sob influência direta de atividade industrial.
- Estimar a sensibilidade e a adequação deste bioensaio como uma ferramenta para o controle da qualidade ambiental.

Um segundo enfoque relaciona-se com a comparação dos dados obtidos para as amostras que estão sob influência de dejetos de origem industrial com os resultados apresentados na Dissertação de Mestrado de Renata Medina da Silva (1999), referentes à toxicidade genética de efluentes sob impacto de despejos municipais. Dentro desta perspectiva visamos correlacionar os riscos genéticos impostos por estes dois tipos de

dejetos, uma vez que as amostras, urbana e industrial, foram coletadas simultaneamente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Pontos de Coleta

Amostras de água do rio Caí - sob influência de despejos industriais e urbanos - foram coletadas nos meses de março, junho e setembro de 1999. A escolha dos locais de amostragem foi determinada em função da presença do Pólo Petroquímico do Sul, e pelo significativo volume de resíduos municipais lançados pelas cidades de Montenegro e São Sebastião do Caí.

O primeiro ponto sob influência industrial – Km 18,6 – localiza-se na foz do Arroio Bom Jardim, próximo à área de disposição do efluente industrial final líquido, e da drenagem das áreas de disposição dos resíduos sólidos do complexo industrial. Já o segundo – Km 13,6 – situa-se no canal da bacia de acumulação e segurança 7 que recebe também a drenagem pluvial (Figura 6). Três pontos que estão sob a influência da descarga direta de dejetos urbanos não-tratados foram selecionados para a dissertação de Renata Medina da Silva (1999). O primeiro, no centro da cidade de Montenegro – Km 52 – enquanto que os demais se localizam na área urbana de São Sebastião do Caí – Km 78 e Km 80. Um controle de campo – a nascente de um riacho localizada em uma área conservada, com fraca ação antrópica e próxima aos pontos do rio – também foi incluído nesta avaliação (Figura 7).

As coletas foram realizadas por técnicos da COPESUL, acompanhados pelos alunos de mestrado envolvidos nos projetos de controle da qualidade das águas do rio

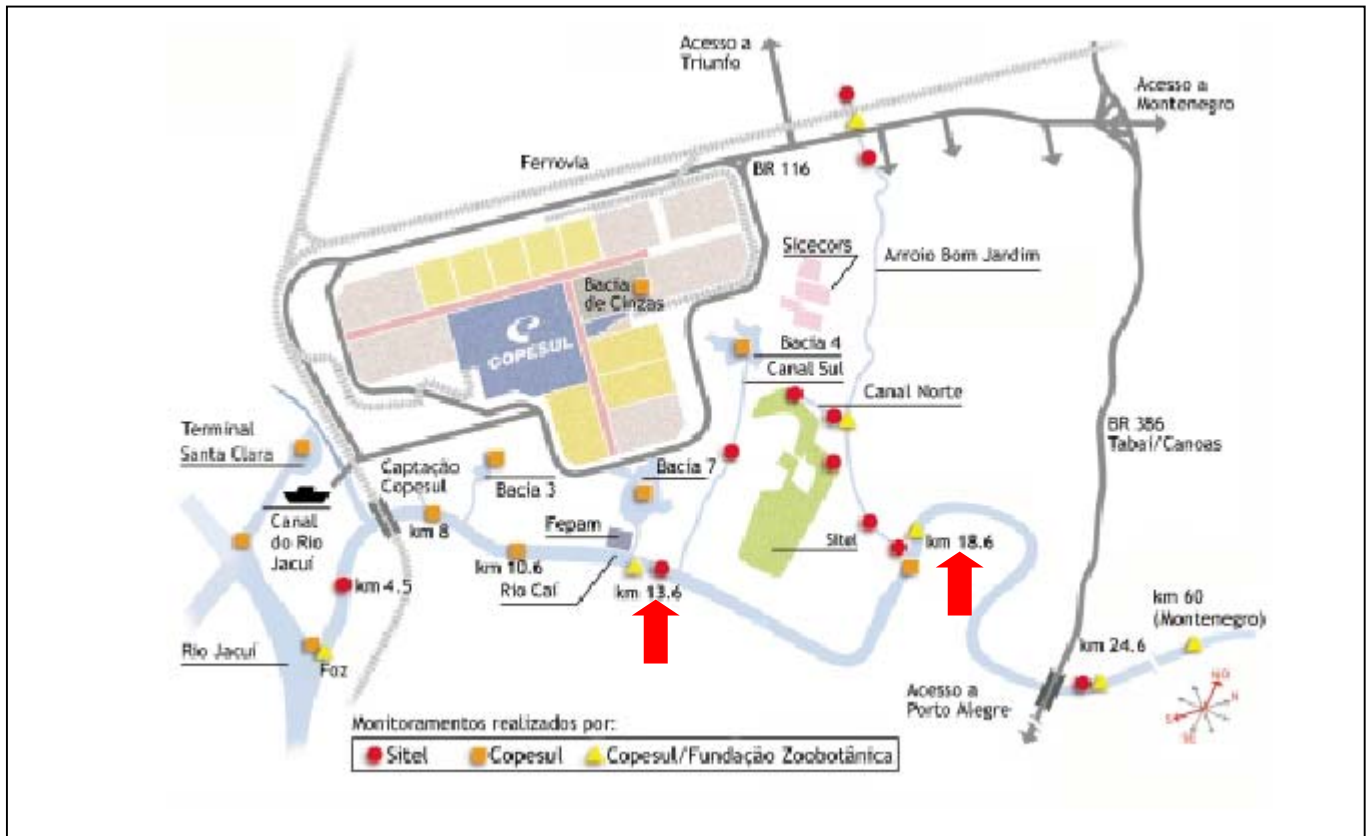


Figura 6: Pontos de coleta (Km13,6 e Km18,6) situados na área de influência do Pólo Petroquímico do Sul (Copesul, 2001).

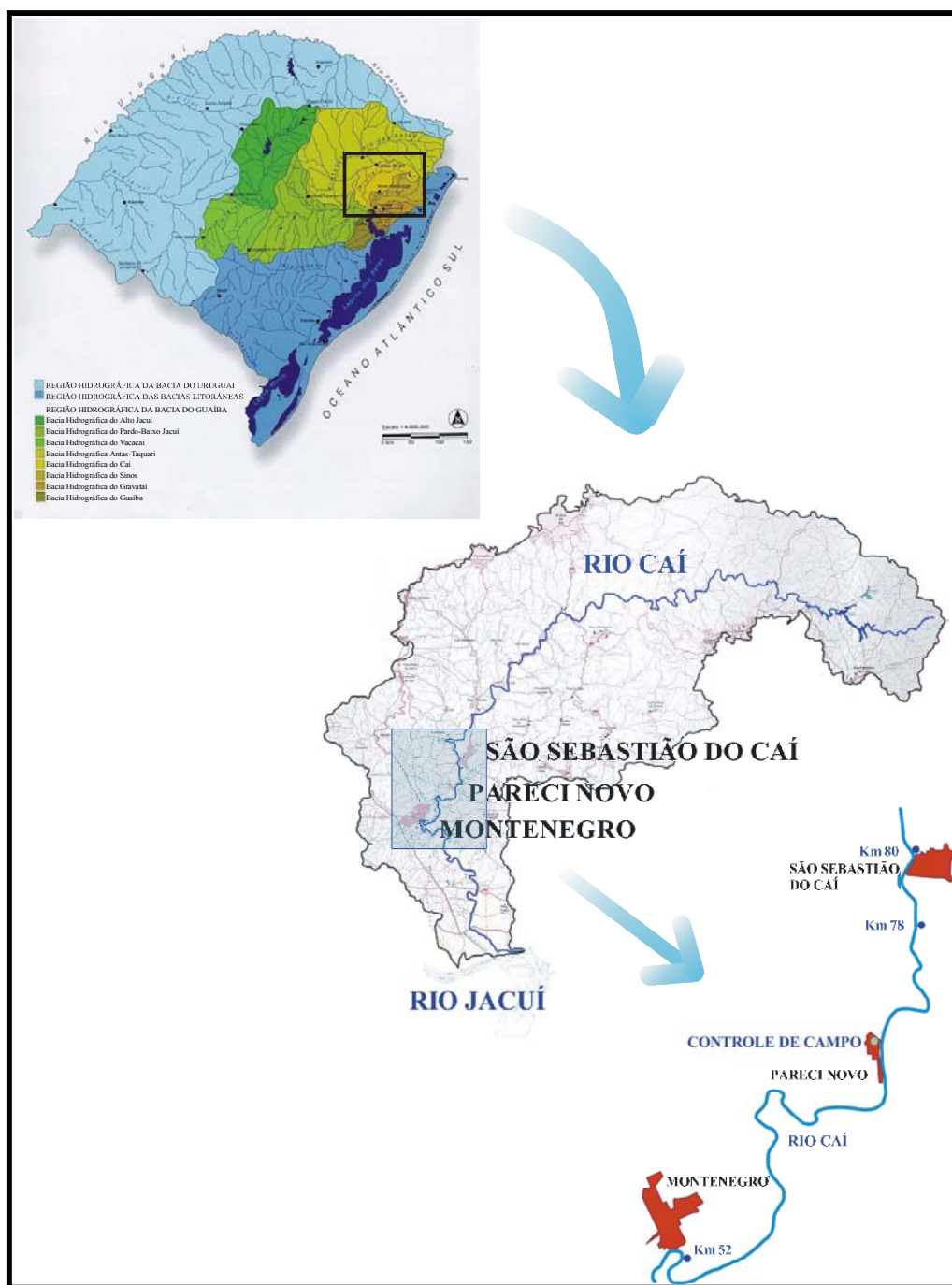


Figura 7: Pontos de coleta sob influência de despejos urbanos (Km52, Km78 e Km80) provenientes dos municípios de Montenegro e São Sebastião do Caí (Silva, 1999).



Caí. Para cada ponto foram coletados aproximadamente 500 ml de água superficial (20 cm de profundidade), que foram armazenadas em garrafas de vidro, devidamente identificadas e vedadas. As amostras foram filtradas em filtro de papel comum, divididas em alíquotas de 50 ml e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Vargas *et al.*, 1993).

### 3.2. Meios de Cultura e Condições de Cultivo

Os estoques de *Drosophila melanogaster*, assim como os cruzamentos de moscas adultas, foram mantidos em vidros de  $\frac{1}{4}$  l contendo meio de cultura padrão.

Para obtenção de larvas de terceiro estágio, foi utilizado o meio de ovoposição, composto por uma base sólida de ágar 2,35% (Biobrás S.A.) coberta com uma camada de fermento biológico (Fleischmann e Royal Ltda.) – preparado em banho-maria ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ), com adição de sacarose – até que fosse atingida a consistência pastosa. Em seguida, foi colocado o meio em vidro de  $\frac{1}{4}$  l contendo a base de ágar, e submetido à ventilação, visando a parada do processo de fermentação e a secagem de sua superfície (Graf *et al.*, 1984).

O tratamento das larvas foi realizado em tubos plásticos  $\frac{1}{36}$  l contendo 1,5 g de meio sintético (Fórmula 4-24, Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina) acrescido de 5 ml das diferentes diluições de tratamento.

Todas as culturas de *Drosophila melanogaster* foram mantidas à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 60 a 70%.

### 3.3. Teste Para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

#### 3.3.1. Linhagens Utilizadas

As linhagens de *Drosophila melanogaster*, utilizadas no presente trabalho, portam os seguintes marcadores genéticos mapeados, no cromossomo 3, que permitem detectar a indução de mutação e recombinação em células somáticas:

- **ORR;flr<sup>3</sup>** – ORR;flr<sup>3</sup>/In (3LR)TM3, r<sup>1</sup> p<sup>o</sup> sep I(3)89Aabx<sup>34e</sup> e Ba<sup>δ</sup>
- **mwh** - mwh/mwh

Para maiores esclarecimentos a respeito dos marcadores genéticos, acima apresentados, ver Lindsley e Zimm (1992).

#### 3.3.2. Cruzamentos

Nesta abordagem experimental foi empregado o cruzamento aprimorado, que se baseia no cruzamento de fêmeas virgens ORR;flr<sup>3</sup> com machos mwh. As fêmeas ORR;flr<sup>3</sup> são portadoras de cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon (R) resistente ao DDT (Dapkus e Merell, 1977; Frölic e Würgler, 1989). Um gene principal (R), presente no cromossomo 2, juntamente com genes menores existentes no cromossomo 1, conferem a esta linhagem alto nível constitutivo de citocromo P450 (Hällstron e Blanck, 1985).

Este cruzamento origina larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3:

- larvas *mwh +/ + flr<sup>3</sup>* - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr<sup>3</sup>*.
- larvas *mwh +/TM3, Bd<sup>δ</sup>* - heterozigotas para o cromossomo *TM3*. Os adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Bd<sup>δ</sup>* - o que permite diferenciá-los dos imagos trans-heterozigotos, que apresentam asas com formato normal (Garcia-Bellido e Dapena, 1974).

### 3.3.3. Tratamentos

Cada amostra de origem industrial foi diluída em água destilada e testada em duas concentrações (25% e 50%) assim como, na sua forma crua (100%). Como controles negativos foram utilizadas, água destilada e alíquotas do controle de campo. O uretano (uretano, 51-79-6; Sigma Cheminal Co; St. Louis, MO, USA), na concentração de 20 mM, foi incluído como controle positivo.

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas:40 machos), durante 3 dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Passado este período, os indivíduos foram transferidos para tubos de ¼ l contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 h, sendo em seguida descartados. Após 72 h do início do período de ovoposição, larvas de terceiro estágio foram coletadas por flotação em água corrente. Estas larvas foram, então, colocadas em frascos de 1/36 l (aproximadamente 50 por tubo) contendo 1,5g de meio sintético, onde foram acrescentados 5ml das soluções de tratamento. As larvas permaneceram nestas condições por aproximadamente 48 horas - tratamento crônico - até atingirem o estágio de pupa.

Através deste procedimento experimental, as células dos discos imaginais, que irão originar as asas dos adultos, ficam expostos às diferentes soluções de tratamento por 5 a 6 ciclos mitóticos, correspondendo a 95% de todas as divisões celulares que ocorrem desde o desenvolvimento do embrião até o início do estágio de pupa (Frei *et al.*, 1992).

Todos os adultos, nascidos entre 10-12 dias após a postura dos ovos, foram conservados em etanol 70%.

### 3.3.4. Montagem das Lâminas

Na montagem das lâminas utilizaram-se somente os indivíduos trans-heterozigotos. Os adultos portadores deste genótipo foram lavados em água corrente e, então, colocados em solução de FAURE (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato de cloral e 50ml de água). As asas foram destacadas com auxílio de uma pinça de relojoeiro, distendidas sobre a superfície de lâminas de vidro e cobertas com lamínulas (24 x 32mm) contendo uma gota de solução de FAURE. (Graf *et al.*, 1984).

### 3.3.5. Análise Microscópica

Para cada ponto de tratamento foram analisadas as asas de pelo menos 20 indivíduos de cada sexo. Esta análise foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 400x – visando à identificação dos fenótipos dos pêlos ou tricomas existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas dos adultos.

Foram identificadas e contadas as manchas que expressaram os fenótipos dos genes *mwh* (pêlos múltiplos) e *flr*<sup>3</sup> (pêlos com a base alargada). Esta análise visou a

classificação das manchas em: simples *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*, quando somente um dos marcadores se expressou; ou gêmeas, onde ambos os fenótipos mutantes estavam presentes. A determinação da posição e do tamanho das manchas foi feita de acordo, respectivamente, com o setor da asa e o número de células portadoras do fenótipo mutante. As manchas foram divididas em classes de diferentes tamanhos: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, -64, -128, -256, -1024, >1024; sendo as duas primeiras classificadas como manchas pequenas e as demais como manchas grandes. São consideradas manchas independentes aquelas separadas por 3 ou mais fileiras de pêlos normais (Graf *et al.*, 1984).

### 3.4. Bases Genéticas

Por meio da análise dos tricomas presentes nas asas dos adultos trans-heterozigotos e pelo tipo de mancha encontrada, pode-se caracterizar a ocorrência de eventos genotóxicos específicos. Manchas simples com os fenótipos de pêlos múltiplos ou pêlos com a base alargada originam-se por:

- (i) alteração no conteúdo informacional dos genes selvagens *flr<sup>3+</sup>* ou *mwh<sup>+</sup>*;
- (ii) deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens *flr<sup>3+</sup>* ou *mwh<sup>+</sup>*;

Além disso, a ocorrência de recombinação simples entre os locos *flr<sup>3</sup>* e *mwh* leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo pêlos múltiplos, enquanto que uma recombinação simples entre *flr<sup>3</sup>* e o centrômero seguida de uma recombinação simples entre *flr<sup>3</sup>* e *mwh* origina manchas contendo pêlos com a base alargada. Desta forma, fica caracterizado que as manchas simples podem originar-se tanto por eventos

mutacionais – incluindo mutações pontuais e cromossômicas – como por recombinação mitótica. Por outro lado, manchas gêmeas, que expressam concomitantemente os fenótipos *flr<sup>3</sup>* e *mwh*, são produtos exclusivos de eventos recombinacionais – envolvendo a ocorrência de uma recombinação simples entre *flr<sup>3</sup>* e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental (Figura 8).

### 3.5. Análise Estatística

A análise estatística julga se a fração das asas que apresentam pelo menos uma mancha de um tipo particular (simples pequena, simples grande ou gêmea) está aumentada nas séries tratadas, quando estas são comparadas com o controle negativo.

Foi empregado o procedimento de Selby & Olson (1981) que está baseado em duas hipóteses:

- (i) a frequência de mutação (espontânea + induzida) nas moscas tratadas não é maior que a frequência de mutação no respectivo controle;
- (ii) a frequência de mutação induzida nas moscas tratadas não é menor que  $m$  vezes a maior frequência de mutação espontânea observada no controle.

Cada hipótese foi testada em um nível de significância de 5%.



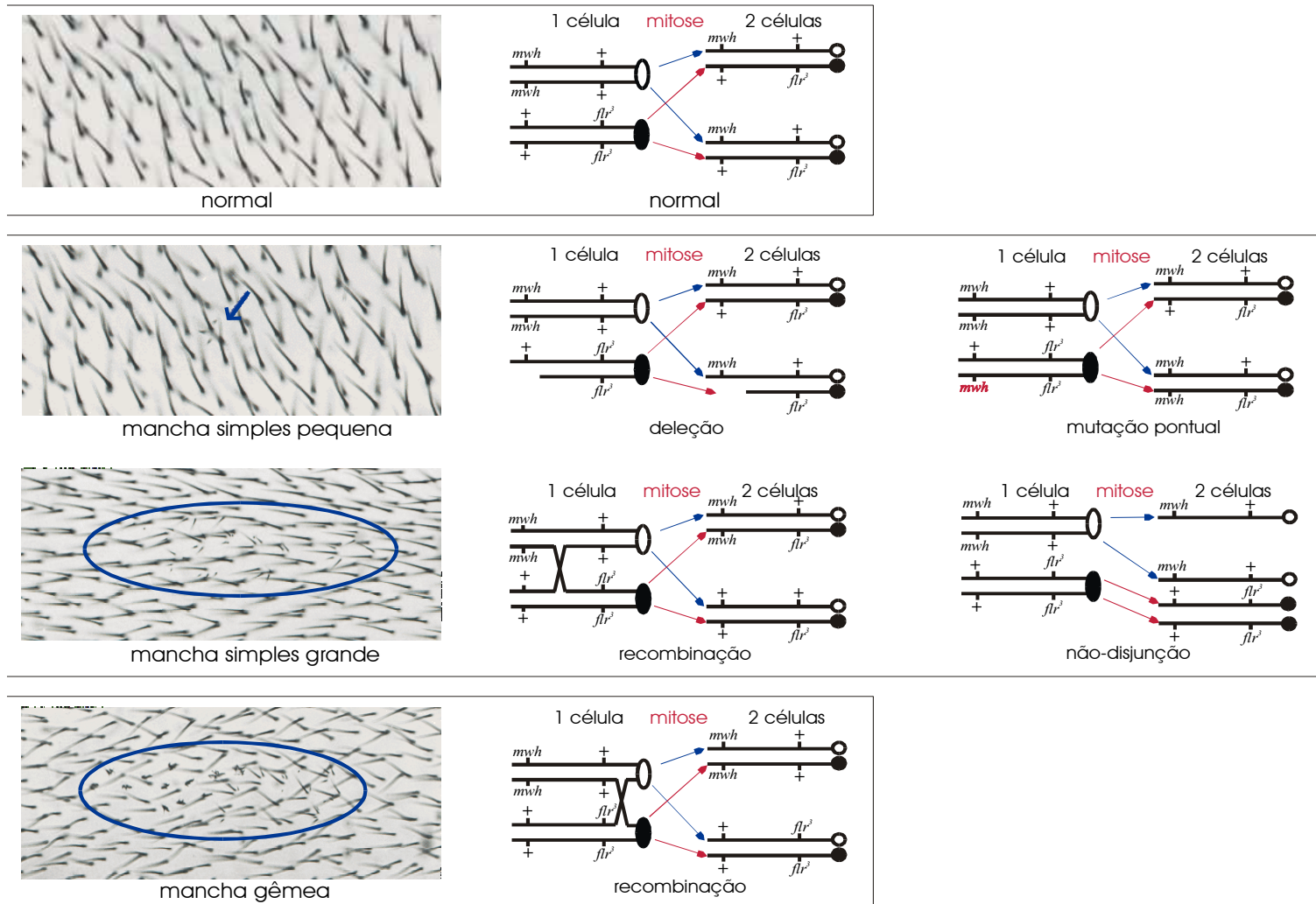


Figura 8. Esquema dos eventos genotóxicos detectados pelo bioensaio SMART (Silva, 1999).



Através deste procedimento foram possíveis quatro decisões:

- (i) INCONCLUSIVA - quando se aceitam ambas as hipóteses;
- (ii) NEGATIVA - aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda;
- (iii) POSITIVA - rejeita-se a primeira hipótese e aceita-se a segunda;
- (iv) FRACO-POSITIVA - rejeitam-se ambas as hipóteses.

Como as manchas simples pequenas e o total de manchas simples têm uma alta frequência de mutação espontânea, o valor multiplicador  $m$  é fixado em 2. Para as manchas simples grandes e gêmeas, que são raras, é utilizado  $m = 5$  (Russel *et al.*, 1981).

A análise estatística foi realizada utilizando o programa de computador SMART 4 MAC 2.0 (Zordan, não publicado) que emprega o teste de  $\chi^2$  para proporções e segue o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

## 4. RESULTADOS

Neste estudo, foram avaliadas, através do teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*, as potencialidades genotóxicas de amostras de água que se encontram sob influência direta de despejos industriais - que foram coletadas em três períodos no decorrer do ano de 1999, os meses de março, junho e setembro. Para todas as amostras testadas, foram realizados dois experimentos independentes, cujos resultados individuais não diferiram significativamente entre si - quando comparados através do teste de qui-quadrado - de tal forma que os dados apresentados são a somatória destas repetições. As análises microscópicas referentes à identificação de manchas mutantes centraram-se nas respostas obtidas nos imagos portadoras do genótipo trans-heterozigoto, oriundos do cruzamento aprimorado.

### 4.1. Controles

As freqüências de mutações espontâneas, referentes ao total de manchas por indivíduo, registradas no controle negativo (água destilada) - março (0,75), junho (1,125) e setembro (0,725) - assim como as encontradas para o controle de campo, (março - 0,775; junho - 1,275 e setembro - 1,050) não diferiram significativamente entre si, quando avaliadas através do teste H de Kruskal e Wallis para um  $p > 0,05$  (Sachs, 1982; 1992). Adicionalmente, a comparação destes valores com os controles históricos de nosso laboratório, assim como com controles da literatura revelaram que as taxas de mutação obtidas no presente estudo encontram-se dentro dos valores esperados para o teste SMART de asa (Frei e Würgler, 1996).

A despeito destas similaridades, os dados referentes às frequências dos diferentes tipos de manchas observadas nos grupos tratados com água superficial sob influência de dejetos industriais foram sempre comparados com os valores encontrados para os controles negativos (água destilada).

## 4.2. Avaliação da Genotoxicidade

Nas Tabelas I, II e III são apresentados os dados obtidos através do teste SMART, quando foram consideradas as respostas obtidas nos adultos portadores do genótipo trans-heterozigoto, oriundos do cruzamento aprimorado. Para cada ponto de amostragem, foram avaliadas três diferentes concentrações - diluições de 25% e 50%, assim como a amostra crua (100%) – que foram administradas às larvas de terceiro estágio, através de tratamento crônico oral por 48 horas. Foram também incluídos, em cada experimento, um controle positivo, representado pelo uretano, assim como dois controles negativos, que incluíram o diluente água destilada e o controle de campo. Desta forma, os resultados apresentados para cada amostra, em cada uma das concentrações utilizadas, baseiam-se na análise de 40 moscas adultas (20 machos e 20 fêmeas), totalizando 11.712.000 células por amostra.

Como se pode observar nas Tabelas I, II e III, as duas amostras de origem industrial, nos três meses de coleta, não mostraram efeito genotóxico, uma vez que as frequências das diferentes categorias de manchas não foram significativamente superiores àquelas observadas nos respectivos controles negativos (água destilada). Estes achados sugerem que, nas condições experimentais empregadas, os dejetos de

TABELA I. Diagnóstico estatístico das freqüências de indução de clones mutantes após tratamento com amostras de água do rio Caí coletadas em março de 1999.

Controles e Pontos de Coleta	Conc. (%)	Nº de indivíduos (N)	Clones por indivíduo (Números de clones) Diagn. Estat. <sup>a</sup>				Total de clones mwh <sup>d</sup> (n)
			Manchas Simples Pequenas (1-2 cells) <sup>c</sup> m=2	Manchas Simples Grandes (>2 cells) <sup>c</sup> m=5	Manchas Gêmeas m=5	Total de Manchas m=2	
C.N. <sup>e</sup>		40	0.675 (27)	0.075 (3)	0.000 (0)	0.750 (30)	30
C.C. <sup>f</sup>		40	0.700 (28)	0.050 (2)	0.025 (1)	0.775 (31)	31
Km 18,6	25	40	0.625 (25) -	0.100 (4) i	0.000 (0) -	0.725 (29) -	29
	50	40	0.750 (30) -	0.050 (2) -	0.050 (2) i	0.875 (35) -	34
	100	40	0.750 (30) -	0.075 (3) -	0.000 (0) -	0.825 (33) -	33
Km 13,6	25	40	0.925 (37) i	0.125 (5) i	0.025 (1) i	1,075 (43) -	42
	50	40	0.850 (34) -	0.175 (7) i	0.000 (0) -	1.025 (41) -	41
	100	40	0.775 (31) -	0.100 (4) i	0.025 (1) i	0.900 (36) -	36
C.P. <sup>g</sup>		10	19.100 (191)+ <sup>b</sup>	9.800 (98)+ <sup>b</sup>	2.600 (26)+ <sup>b</sup>	31.500 (315)+ <sup>b</sup>	309

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para avaliação dos resultados negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup> Diagnóstico positivo confirmado pelo teste U <sup>b</sup> $p < 0,05$ , <sup>c</sup> $p < 0,01$ .

<sup>c</sup> Incluindo raras manchas simples *flr*<sup>3</sup>.

<sup>d</sup> Considerando clones *mwh* oriundos das manchas simples e das gêmeas.

<sup>e</sup> Controle negativo: água destilada

<sup>f</sup> Controle de campo

<sup>g</sup> Controle positivo: Uretano (20 mM)

TABELA II. Diagnóstico estatístico das freqüências de indução de clones mutantes após tratamento com amostras de água do rio Caí coletadas em junho de 1999.

Controles e Pontos de Coleta	Conc. (%)	Nº de indivíduos (N)	Clones por indivíduo (Números de clones) Diagn. estat. <sup>a</sup>				Total de clones <i>mwh</i> <sup>d</sup> (n)
			Manchas Simples Pequenas (1-2 cells) <sup>c</sup> m=2	Manchas Simples Grandes (>2 cells) <sup>c</sup> m=5	Manchas Gêmeas m=5	Total de Manchas m=2	
C.N. <sup>e</sup>		40	0.950 (38)	0.125 (5)	0.050 (2)	1,125 (45)	44
C.C. <sup>f</sup>		40	1,075 (43)	0.200 (8)	0.000 (0)	1,275 (51)	51
Km 18,6	25	40	1,000 (40) -	0.050 (2) -	0.025 (1) -	1,075 (43) -	43
	50	40	1,050 (42) -	0.225 (9) i	0.050 (2) -	1,325 (53) -	53
	100	40	1,090 (45) -	0.220 (9) i	0.000 (0) -	1,317 (54) -	54
Km 13,6	25	40	1,000 (40) -	0.075 (3) -	0.000 (0) -	1,075 (43) -	43
	50	40	0.700 (28) -	0.125 (5) -	0.050 (2) -	0,875 (35) -	35
	100	40	0.950 (38) -	0.125 (5) -	0.075 (3) i	1,150 (46) -	45
C.P. <sup>g</sup>		10	44.900 (449)+ <sup>b</sup>	9.200 (92)+ <sup>b</sup>	4.300 (43)+ <sup>b</sup>	58.400 (584)+ <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para avaliação dos resultados negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup> Diagnóstico positivo confirmado pelo teste U <sup>b</sup>p<0,05, <sup>c</sup>p<0,01.

<sup>c</sup> Incluindo raras manchas simples *flr*<sup>3</sup>.

<sup>d</sup> Considerando clones *mwh* oriundos das manchas simples e das gêmeas.

<sup>e</sup> Controle negativo: água destilada

<sup>f</sup> Controle de campo

<sup>g</sup> Controle positivo: Uretano (20 mM)

TABELA III. Diagnóstico estatístico das freqüências de indução de clones mutantes após tratamento com amostras de água do rio Caí coletadas em setembro de 1999.

Controles e Pontos de Coleta	Conc. (%)	Nº de indivíduos (N)	Clones por indivíduo (Números de clones) Diagn. estat. <sup>a</sup>				Total de clones <i>mwh</i> <sup>d</sup> (n)
			Manchas Simples Pequenas (1-2 cells) <sup>c</sup> m=2	Manchas Simples Grandes (>2 cells) <sup>c</sup> m=5	Manchas Gêmeas m=5	Total de Manchas m=2	
C.N. <sup>e</sup>		40	0.650 (26)	0.025 (1)	0.025 (1)	0,725 (29)	28
C.C. <sup>f</sup>		40	0,850(34)	0.125 (5)	0.050 (2)	1,050 (42)	41
Km 18,6	25	40	0,525 (21) -	0.025 (1) -	0.025 (1) -	0,600 (23) -	23
	50	40	0,625 (25) -	0.000 (0) -	0.000 (0) -	0,625 (25) -	25
	100	40	0,525 (21) -	0.075 (3) i	0.000 (0) -	0,600 (24) -	24
Km 13,6	25	40	0,625 (25) -	0.025 (1) -	0.000 (0) -	0,650 (26) -	26
	50	40	0.500 (20) -	0.050 (2) i	0.025 (1) -	0,575 (23) -	23
	100	40	0.550 (22) -	0.075 (3) i	0.000 (0) -	0,625 (25) -	25
C.P. <sup>g</sup>		10	46.400 (464)+ <sup>d</sup>	10.800 (108)+ <sup>d</sup>	5.200 (52)+ <sup>d</sup>	62.400 (624)+ <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para avaliação dos resultados negativos. Nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ .

<sup>b</sup> Diagnóstico positivo confirmado pelo teste U <sup>b</sup> $p < 0,05$ , <sup>c</sup> $p < 0,01$ .

<sup>c</sup> Incluindo raras manchas simples *flr*<sup>3</sup>.

<sup>d</sup> Considerando clones *mwh* oriundos das manchas simples e das gêmeas.

<sup>e</sup> Controle negativo: água destilada

<sup>f</sup> Controle de campo

<sup>g</sup> Controle positivo: Uretano (20 mM)

origem industrial não foram capazes de induzir lesões do tipo mutação gênica, cromossômica, assim como eventos relacionados com recombinação mitótica.

### 4.3. Parâmetros Físico-Químicos

As análises dos parâmetros físico-químicos -- pH, O<sub>2</sub> dissolvido, temperatura do ar e da água, condutividade, assim como a quantificação de cloretos, nitratos, sulfatos e surfactantes (dados não mostrados) – não diferiram dos padrões estabelecidos para mananciais de classe 2, no qual se enquadra o rio Caí (CONAMA, 1986). Entretanto, os valores pluviométricos observados durante os períodos de coleta foram dez vezes maiores nos meses de Junho (112,6 mm) e Setembro (110,9 mm), em relação aos obtidos em Março (12,3 mm).

## 5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo apontam para a ausência de genotoxicidade das amostras de água superficial, sob influência direta de dejetos oriundos do Pólo Petroquímico do Sul, coletadas em três diferentes meses ao longo do ano de 1999. De fato, a avaliação da toxicidade genética centrou-se no emprego do teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster*, procurando contribuir não apenas para o controle da qualidade das águas do curso inferior do rio Caí, mas também para a validação do seu emprego como uma ferramenta para o diagnóstico da genotoxicidade de amostras de origem industrial.

Pelo menos três aspectos fundamentados na (i) validade do SMART como indicador de contaminação de amostras de água superficial associada a misturas complexas, na (ii) escolha do cruzamento aprimorado como indicativo da toxicidade genética, assim como nos (iii) dados previamente obtidos com o teste SMART - para amostras sob influência de dejetos de origem urbana, associados às cidades de São Sebastião do Caí e a Montenegro (Silva., 1999) - merecem ser discutidos.

Ao longo dos últimos quatro anos, o nosso grupo de trabalho preocupou-se em avaliar a genotoxicidade associada a amostras de água superficial, que estão sob influência de dejetos urbanos e industriais. Para este fim, foi utilizado o teste SMART, que apesar de pouco aplicado como ferramenta para o diagnóstico da ação genotóxica de amostras ambientais, tem fornecido resultados relevantes no que tange a toxicidade genética de partículas aéreas. De fato, quando este bioensaio foi empregado para avaliar a ação genotóxica de amostras de ar, coletadas na cidade do México, observou-se não apenas a sua adequação, mas também a sua alta concordância



com os dados obtidos - com estas mesmas amostras - através do teste de Ames. Na verdade, esta comparação evidenciou a sensibilidade do ensaio SMART para a avaliação da genotoxicidade de amostras complexas (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1993, 1999).

Outro ponto relevante, que indiretamente justifica o emprego do teste SMART para o monitoramento da toxicidade genética de amostras ambientais, relaciona-se com os dados obtidos por diferentes autores para misturas complexas. De fato, através da aplicação deste bioensaio foi possível quantificar, e em algumas vezes qualificar, os danos genéticos induzidos por diferentes tipos de bebidas, alcoólicas ou não - como extratos de chás (*Urtica dioica*, *Achillea millefolium* e *Camellia sinensis*), diversos tipos de cafés, vinhos e conhaque. Na tentativa de elucidar a contribuição do etanol, da quercetina e da rutina para a atividade genotóxica observada, foram realizados experimentos adicionais, usando diferentes concentrações destes três compostos. Através desta nova abordagem demonstrou-se que a quercitina e a rutina são capazes de induzir mutações pontuais e/ou aberrações cromossômicas, não apresentando uma relação direta entre dose/efeito. Desta forma, os autores sugerem que a genotoxicidade observada esteja correlacionada com a presença destes flavonóides (Graf *et al.*, 1994). Considerando que a análise dos efeitos tóxico-genéticos de amostras totais de origem ambiental está centrada na detecção de respostas relacionadas com a interação de diferentes genotoxinas, e algumas vezes anti-genotoxinas, justifica-se a inclusão dos dados referentes à sensibilidade do teste SMART como indicador da toxicidade genética associada a misturas complexas.

É um fato bem estabelecido que ensaios capazes de detectar pró-genotoxinas - substâncias que exercem atividade genotóxica através dos seus metabólitos - fornecem

uma resposta mais ampla sobre a toxicidade genética inerente às misturas complexas. Entretanto, diversos estudos centrados em amostras de origem ambiental, revelam que a adição de enzimas de metabolização leva a uma marcada redução na toxicidade genética das amostras. Este tipo de resposta foi observado para efluentes das indústrias de papel e celulose, avaliados através do teste de Ames, nos quais a ação mutagênica teve uma drástica diminuição, quando se adicionou a fração S9 (McGeorge *et al.*, 1985; Kamra *et al.*, 1983). Respostas similares foram também obtidas para dejetos de indústrias de compostos orgânicos, corantes (McGeorge *et al.*, 1985), assim como para indústrias farmacêuticas (Houk e DeMarini, 1988). Ainda que seja sugerido que este decréscimo está relacionado com a detoxificação de determinadas genotoxinas, em detrimento de sua bioativação, Kamra *et al.* (1983) mostraram que a adição da fração S9 a misturas que não contém os co-fatores requeridos, ou a utilização de frações S9 inativadas por calor, causa redução na potência mutagênica de despejos industriais (White *et al.*, 1996).

Entretanto, há situações em que a presença de S9 aumenta o efeito genotóxico de amostras de origem industrial, uma vez que a presença de pró-genotoxinas na mistura, que está sendo avaliada, só é detectada quando seus metabólitos ativos são formados, via enzimas de metabolização. (Heflich, 1991). De fato, acréscimos na potência mutagênica, detectados através do teste de Ames, foram observados em 12 amostras que estão sob a influência direta de dejetos provenientes de indústrias de papel e celulose, forja, refinamento de metal, compostos orgânicos, assim como refinarias de petróleo (McGeorge *et al.*, 1985; Somani *et al.*, 1980; Houk 1992; White *et al.*, 1996). Dentro deste contexto, é importante enfatizar que de acordo com McGeorge *et al.* (1985), Metcalfe *et al.* (1985) e White *et al.* (1996) a toxicidade

genética associada a amostras de água, que estão sob influência de refinarias de petróleo, é, na grande maioria das vezes, potencializada na presença de S9.

Um grande número de genotoxinas, incluindo nitrosaminas, carbamatos, arilaminas e arilamidas, assim como aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), requerem ativação metabólica para que a sua atividade mutagênica se expresse (Heflich, 1991). Cabe ainda ressaltar que resíduos provenientes de refinarias de petróleo, alumínio e forja contém um alto volume de PAHs e compostos relacionados – o que pode justificar a necessidade de sua avaliação em protocolos de tratamento que incluam a presença exógena ou endógena de enzimas de metabolização (IARC, 1984, 1989a; Woo e Arcos, 1981; White *et al.*, 1996). Ao mesmo tempo, é importante considerar que a ação genotóxica de PAHs, inseticidas e herbicidas, através do teste SMART, só é observada quando se emprega o cruzamento aprimorado (Delgado-Rodriguez *et al.*, 1995; Frölich e Würigler, 1990; Osaba *et al.*, 1999 e Kaya *et al.*, 2000).

Entretanto, deve-se também considerar que estudos realizados no rio Caí, na área de influência do Pólo Petroquímico do Sul, mostraram que o emprego de sistemas de metabolização pode causar o desaparecimento da resposta genotóxica das amostras. De fato, o uso da fração S9 levou a perda de mutagenicidade em 62% dos casos positivos, quando o teste de Ames foi aplicado em ausência de fração de metabolização, enquanto 24% permaneceram positivos - ainda que em 14% tenha persistido a citotoxicidade. Da mesma forma, cerca de 33% das amostras que haviam sido diagnosticadas como destituídas de atividade mutagênica mostraram respostas positivas após metabolização (Vargas *et al.*, 1993).

Considerando esta diversidade de respostas, o primeiro delineamento realizado pelo nosso grupo de trabalho, visando a detecção de genotoxicidade associada não

apenas aos despejos de origem industrial mas também aos urbanos, constou de uma bateria de experimentos preliminares, que empregaram o teste SMART nas suas duas versões: os cruzamentos padrão (larvas com níveis basais de metabolização) e aprimorado (larvas com altos níveis constitutivos de enzimas de metabolização) (Graf *et al.*, 1984, 1996). A partir desta abordagem experimental foi possível constatar que nas amostras industriais - nos sites de coleta Km10,1, Km 24,1 e Km 13,6 - as respostas positivas restringiram-se aos dados obtidos através da análise dos imagos provenientes do cruzamento aprimorado (Silva, comunicação pessoal). No entanto, em relação aos despejos urbanos, observaram-se acréscimos significativos, nas freqüências totais de manchas, somente quando foram usadas larvas do cruzamento padrão (Silva, 1999). Desta maneira, a escolha do tipo de cruzamento, que melhor representaria a genotoxicidade associada às amostras sob o impacto de indústrias petroquímicas, recaiu sobre o cruzamento aprimorado, que se caracteriza por altos níveis de enzimas do tipo P450 6A2 (Saner, 1995).

Cabe ainda ressaltar, que a ausência de genotoxicidade associada às amostras industriais, observada no presente estudo, não invalida, obrigatoriamente, o emprego do teste SMART como indicativo da contaminação ambiental. Na verdade, Silva (1999) utilizou este bioensaio para detectar a toxicidade genética associada a amostras sob influência de despejos urbanos – que foram coletadas simultaneamente as amostras avaliadas. Como anteriormente relatado, foram realizados testes preliminares, visando a identificação do tipo de cruzamento que forneceria um maior número de respostas positivas e/ou uma maior potência – sendo identificado o cruzamento padrão como o melhor indicador. Os dados obtidos apontaram para a ação genotóxica das amostras coletadas, nos três diferentes pontos no mês de março – Km 52, 78 e 80 (Figura 7). Este comportamento não foi observado para o mês de junho – já que não foram obtidos

aumentos significativos, para todos os tipos de manchas, em relação ao controle negativo. Já as coletas de setembro evidenciaram a genotoxicidade associada ao Km 52 – localizado próximo à cidade de Montenegro (Gráfico 2). Os dados de toxicidade genética, obtidos por Silva, (1999), foram basicamente diagnosticados por aumentos expressivos nas freqüências de manchas simples pequenas, que correspondem a clones com uma ou duas células mutadas. Estas manchas podem ser o resultado da perda de fragmentos cromossômicos e/ou de um cromossomo inteiro – já que células portadoras de monossomia e/ou grandes deleções dividem-se esporadicamente, podendo passar por, no máximo, dois ciclos de divisão mitótica, o que leva a formação exclusiva de manchas simples pequenas. Conseqüentemente, pode-se inferir que aberrações cromossômicas numéricas e estruturais (do tipo perda de fragmentos cromossômicos) seriam os eventos genotóxicos mais fortemente relacionados à toxicidade genética induzida por águas contaminadas por dejetos municipais – o que é reforçado por diferentes trabalhos experimentais (Nielsen e Rank, 1994; Smaka-Kincl *et al.*, 1996; Grover e Kaur, 1999).

Ainda mais, considerando os resultados observados nos meses de março e junho, sugere-se uma correlação entre o nível pluviométrico e o diagnóstico positivo. De fato, no mês de março, foram registrados índices de pluviosidade de 12,3 mm, enquanto que no mês de junho (112,6 mm) estes valores foram aproximadamente dez vezes superiores. Este tipo de associação, entre ação genotóxica e efeito de diluição das águas do rio, foi também observado em estudos anteriores, que utilizaram tanto o ensaio de micronúcleos em *Vicia faba* (Duan *et al.*, 1999a) quanto o teste de Ames em *Salmonella typhimurium* (Kusamran *et al.*, 1994). Entretanto, esta correlação não pode explicar os resultados positivos obtidos para o Km 52, coletado em setembro – já que a

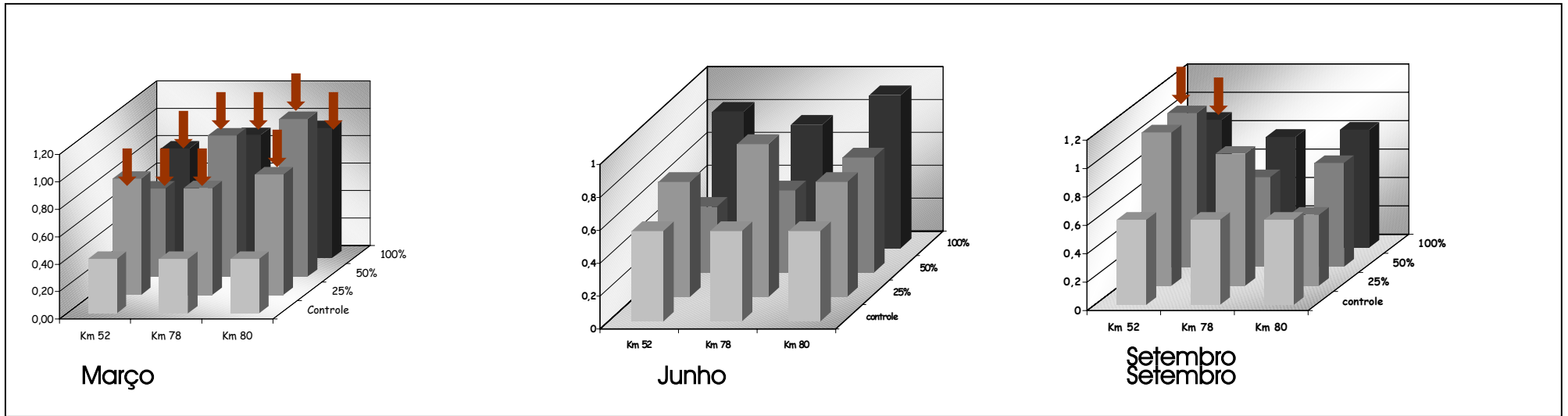


Gráfico 2: Distribuição e diagnóstico estatístico das freqüências totais de indução de clones mutantes após tratamento com amostras de água do rio Caí (Km 52, 78 e 80)– sob influência de dejetos urbanos , coletadas em março, junho e setembro de 1999 (Silva, 1999).

pluviosidade (110,9 mm) foi tão elevada quanto à registrada em junho. Ainda que a diluição das águas do rio não tenha sido um fator determinante para a genotoxicidade deste ponto, esta resposta pode estar relacionada com a descarga diferencial de dejetos de pequenas indústrias - que incluem matadouros, frigoríficos, indústrias alimentícias, fábricas de tanino, de refrigerantes e indústrias de emulsões de asfalto – que não apresentam qualquer estratégia de tratamento e que juntamente com os esgotos cloacais e pluviais, são lançados diretamente no rio Cai (Silva, 1999). Ainda que tenha sido sugerida uma correlação entre genotoxicidade positiva e índice pluviométrico – para os dejetos urbanos coletados em março de 1999 – este tipo de relação não foi identificada para as amostras industriais – assim como para os demais parâmetros físico-químicos analisados.

Outro ponto que deve ser discutido, relaciona-se com a escolha da metodologia de tratamento mais apropriada para análises de misturas complexas: o método direto, extração líquido-líquido ou extração de substâncias voláteis. A presença de substâncias voláteis, com atividade mutagênica, serve de alerta para a utilização de metodologias de tratamento que não preservam este tipo de composto. De fato, amostras com ação mutagênica positiva, avaliadas pelo método direto de concentração, perderam esta atividade após extração líquido-líquido. Concomitantemente, o estudo de concentrados de produtos voláteis confirmou a importância destes compostos na indução de lesões mutagênicas, e portanto, a sua contribuição para a genotoxicidade (Vargas, 1992; Vargas *et al.*, 1995).

As vantagens das técnicas de fracionamento/extração incluem a separação de componentes ativos de inativos, assim como a extração de agentes químicos presentes em pequenas quantidades. Entretanto, deve-se considerar, que esta metodologia também apresenta desvantagens: a probabilidade de perda ou modificação dos

componentes, a presença de artefatos nas amostras, e talvez, ainda mais importante, a perda de informações no que se refere à toxicidade genética da mistura complexa - contendo diferentes genotoxinas que podem interagir entre si, levando a efeitos aditivos, sinérgicos e até mesmo antagonistas. (Chen *et al.*, 1983); (Houk, 1992).

Uma alternativa para o diagnóstico da genotoxicidade de dejetos industriais, é considerar a mistura como um todo, ou seja, avaliá-la na sua forma crua, ao invés de fracioná-la. Vários sistemas biológicos e bioensaios de curta-duração foram empregados para a avaliação de amostras cruas - que revelaram algumas das vantagens desta metodologia. Dentre estas, destaca-se o fato de que as respostas obtidas permitem uma melhor extrapolação às condições ambientais, aliadas a menor probabilidade da ocorrência de artefatos gerados pelos processos de extração/concentração ou fracionamento, e a não eliminação dos efeitos interativos entre os diferentes compostos das amostras (Houk, 1992).

Entretanto, nem todas as misturas podem ou devem ser testadas no seu estado cru. Muitas vezes, um resíduo é muito tóxico para ser testado diretamente no bioensaio, da mesma forma que a amostra pode não ser compatível com o sistema-teste a ser empregado, em função das suas propriedades físicas (lodos, óleos, emulsões.). Outra desvantagem inclui o possível mascaramento da atividade do composto exercida pelas interações químicas com outras genotoxinas presentes na amostra total (Cunningham *et al.*, 1985 ; Houk, 1992).

Finalmente, fica a sugestão de que, pelo menos em nossas condições experimentais, o impacto causado por despejos de origem urbana pode ser mais intenso do que aquele imposto por dejetos provenientes de indústrias de grande porte. De fato, apesar da extensiva procura de informações bibliográficas, referentes à contribuição dos despejos urbanos para a genotoxicidade associada a águas



superficiais do curso inferior do rio Cai, não foram encontrados registros de estudos - tanto centrados na toxicidade genética de despejos urbanos, quanto na comparação entre amostras de origem industrial e urbana. Consideramos, também relevante, o conjunto de dados publicados por White *et al.*(1996) e White e Rasmussen (1998), que apontam para os prejuízos causados por dejetos urbanos – que podem ser tão ou mais nocivos que os impostos pelos despejos de origem industrial. Esta maior potência genotóxica pode ser atribuída ao seu maior volume de lançamento, assim como à sua natureza mais complexa - já que são formados pelo somatório de resíduos domésticos e de indústrias de pequeno porte, que na grande maioria das vezes não utilizam qualquer tipo de tratamento.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Artavanis-Tsakonas,S., Matsumoto,K. and Fortini,M.E. (1995) Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of *Drosophila melanogaster*, as measured in the wing spot test. *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 47-51.

Bickham,J.W., Sandhu,S., Hebert,P.D.N., Chikhi,L. and Athwal,R. (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.*, **463**, 33-51.

Bridges,B.A., Penn,A., Hansen,E.S. and Wakabayashi,K. (1990) The possible involvement of somatic mutations in the development of arteriosclerotic plaques. *Mutat. Res.*, **239**:143-188.

Černá,M., Pastorková,A., Šmíd,J., Bavorova,H., Ocadlíková,D., Rössner,P. and Zavadil,J. (1996) Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. *Toxicol. Lett.*, **88**, 191-197.

Chen,D.J., Deaven,L.L. Meyne,J., Okinaka,R.T. and Strniste,G.F. (1983) Determination of direct-acting mutagens and clastogens in oil shale retort process waster, in: M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff and S. Nesnow (eds.), Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, III, Plenum Press, New York, pp. 269-275

CONAMA (1986) Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 de jul, 78-95.

Copesul, 2001. <http://www.copesul.com.br>

Claxton,L.D., Houk,V.S. and Hughes,T.J. (1998) Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, **410**, 237-243.

Cunningham, M.L., Haugen, D.A., Kirchner, F.R. and Reilly, C.A. (1985) Toxicology responses to a complex coal conversion by-product: mammalian cell mutagenicity and dermal carcinogenicity, in: M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss, and S. Nesnow (eds.), *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, IV*, Plenum Press, New York, pp. 113-123.

Dapkus, J. and Merrell, D.J. (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **87**, 685-697.

Delgado-Rodriguez, A., Ortíz-Marttelo, R., Graf, U., Villalobos-Pietrini, R. and Gómez-Arroyo, S. (1993) Genotoxicidad producida por aeropartículas. Resúmenes, Taller Latino-Americano de Genética Toxicológica I. DROSOPHILA MELANOGASTER, Tlaxcala, Mexico

Delgado-Rodriguez, A., Ortíz-Marttelo, R., Graf, U., Villalobos-Pietrini, R. and Gómez-Arroyo, S. (1995) Genotoxicity activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **341**, 235-247.

Delgado-Rodriguez, A., Ortíz-Marttelo, R., Villalobos-Pietrini, R., Gómez-Arroyo, S. and Graf, U. (1999) Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, **39**, 33-43.

Duan, C.-Q., Hu, B., Jiang, X.-H., Wen, C.-H., Wang, Z. and Wang, Y.-X. (1999a) Genotoxicity of water samples from Dianchi Lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.*, **426**, 121-125.

Duan, C.-Q., Hu, B., Wang, Z.-H., Wen, C.-H., Yan, S.-Q., Jiang, X.-H., Wang, D.-K., Li, Q. and Liang, X.-F. (1999b) *Tradescantia* bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mutat. Res.*, **426**, 127-131.

Eckl,P.M. (1995) Aquatic genotoxicity testing with rat hepatocytes in primary culture. II. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations. *Sci. Total Environ.*, **159**, 81-89.

Fearon, E.R. and Vogelstein,B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**:759-767.

FEPAM/GTZ (1997) Levantamento dos Principais Usos do Solo e da Água na Bacia Hidrográfica do Rio Caí. V.1 Projeto de Cooperação Técnica Brasil/Alemanha, Porto Alegre, 138p.

Frei,H., Clements,J., Howe,D. and Würigler,F.E. (1992) The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **279**, 21-33.

Frei,H. and Würigler,F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, **203**, 297-308.

Frei,H. and Würigler, F.E. (1996) Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, **11**, 315-325.

Frölich,A. and Würigler,F.E. (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.*, **216**, 179-187.

Frölich,A. and Würigler,F.E. (1990) *Drosophila* wing spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.*, **234**, 71-80.

Garcia - Bellido, A. and Dapena, J. (1974) Introduction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Molec.Gen. Genet.*, **128**, 117-130.

Graf,U., Würigler,F.E., Katz,A.J., Frei,H., Juon,H., Hall,C.B. and Kale,P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, **6**, 153-188.

Graf,U. and Würigler,F.E. (1986) Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. *Fd. Chem. Toxic.*, **24**, 835-842.

Graf,U. and van Schaik,N. (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **271**, 59-67.

Graf,U.,A. Moraga,A. Castro,R. and Díaz Carrillo,E. (1994) Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombinaton test. *Fd. Chem. Toxicol.*, **32**, 423-436.

Graf,U. (1995) Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, **51**, 168-173.

Graf,U., Spanó,M.A., Guzmán-Rincón,J., Abraham,S.K. and Andrade,H.H. (1996) The the wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr. Newsl. Occup. Health Saf.*, **6**, 9-13.

Grover,I.S. and Kaur,S. (1999) Genotoxicity of wastewater samples sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.*, **426**, 183-188.

Hällstron,I. and Blanck, A. (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. *Chem-Biol Interact.*, **56**, 157-171.

- Hartley, D. (1996) *Drosophila* inherit diseases. *Nature Genet*, **13**, 133-134
- Heflich,R.H. (1991): Chemical mutagens. in: A.P. Li, and R.H. Heflich (eds), *Genetic Toxicology*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 143-102.
- Houk,V.S. (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, **277**, 91-138.
- Houk,V.S. and DeMarini,D. (1998) Use of the microscreen phage-induction assay to assess the genotoxicity of 14 hazardous industrial wastes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 13-29.
- IARC (1984) Polynuclear Aromatic Compounds, Part 3, Industrial Exposures in Aluminum Production, Coal Gasification, Coke Production, And Iron and Steel Founding, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol: 34, Geneva, Switzerland: World Health Organization, pp 43-59.
- IARC (1989) Occupational Exposures in Petroleum Refining; Crude oil and Major Petroleum Fuels, in: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals to Humans, vol: 45, Geneva, Switzerland: World Health Organization, pp 72-110.
- Ji,Q., Yang,H. and Zhang,X. (1999) *Vicia* root-micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou City, People's Republic of China. *Mutat. Res.*, **426**, 133-135.
- Jiang,Y.G., Yu,Z.D., Liu,G.Z., Chen,R.Z. and Peng,G.Y. (1999) Genotoxicity of water samples from the scenic Lijang River in the Guilin Area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res.*, **426**, 137-141.
- Kamra,O.P., Nestmann,E.R., DouglasG.R., KlowlbelD.J. and Garrington,T.R. (1983) Genotoxic activity of pulp mill effluent in *Salmonella* and *Saccharomyces cerevisiae* assays. *Mutat. Res.*, **118**, 269-276.

- Karsten, W. and Krypsin-Sorensen, I. (1988) Penetrance and low concordance in monozygotic twins in disease: are they the result of alterations in somatic genomes? *Molec. Reprod. Dev.*, **1**:63-75.
- Kaya,B., Yanikoğlu,A., Creus,A. and Marcos,R. (2000) Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, **465**, 77-84.
- Kirkwood, T.B.L. (1989) DNA, mutants and ageing. *Mutat. Res.*, **219**:1-8.
- Kusamran,W.R., Wakabayashi,K., Oguri,A., Tepsuwan,A., Nagao,M. and Sugimura,T. (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutat. Res.*, **325**, 99-104.
- Lemos,C.T. and Erdtmann, B. (2000) Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutat. Res.*, **467**, 1-9.
- Lindsley,D.L. and Zimm,G.G. (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego CA, USA, 1133p.
- McGeorge, L.J., Louis, J.B., Atherholt, T.B. and McGarrity, G.J. (1985) Mutagenicity analyses of industrial effluents: results and considerations for integration into water pollution control programs, in: M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss, and S. Nesnow (eds.), *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures, IV*, Plenum Press, New York, pp. 247-268.
- MetcalfC.D., SonstegardR.A. and Quillam,M.A. (1985) Genotoxic activity of particulate material in petroleum refinery effluents. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 40-248.
- Miao,M., Fu,R., Yang,D. and Zheng,L. (1999) *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutat. Res.*, **426**, 143-145.

- Miklos,G.L.G. and Rubin,G.M. (1996) The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell*, **86**, 521-529.
- Nielsen,M.H. and Rank,J. (1994) Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, **121**, 249-254.
- Osaba,L., Aguirre,A., Alonso,A. and Graf,U. (1999) Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, **439**, 49-61.
- Ralph,S. and Petras,M. (1998) Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat. Res.*, **413**, 235-250.
- Russel,L.B, Selby,P.B. von Halle,E., Sheridan,W. and Valcovic,L. (1981) Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: interpretation of past data and recommendations for future work.. *Mutat. Res.*, **86**, 355-379.
- Sachs,L. (1982) *Applied Statistics, a Handbook of Techniques*. Springer Series in Statistics, vol.10, Springer, New York, 706 pp.
- Sachs,L. (1992) *Angewandte Statistik. Anwendung Statistischer Methoden*, 7Th ed., Springer, Berlin, 846 pp.
- Saner,C. (1995) Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 6A2: gene structure, expression pattern and metabolic capacity towards procarcinogens. Thesis 11205, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland.
- Selby,P.B. and Olson,W.H. (1981) Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation rate data in mice indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.*, **83**, 69-74.
- Steinkellner,H., Kassie,F. and Knasmüller,S. (1999) *Tradescantia*-micronucleus assay of the clastogenicity of Austrian water. *Mutat. Res.*, **426**, 113-116.



- Shen,J.H., Gutendorf,B. Vahl,H.H., Shen, L. and Westendorf,J. (2001) Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta. *Toxicology*, **166**, 71-78.
- Silva,R.M. (1999) Genotoxicidade associada a amostras de água do rio Caí sob influência de dejetos urbanos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 100p.
- Smaka-Kincl,V., Stegnar,P., Lovka,M. and Toman,M.J. (1996) The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutat. Res.*, **368**, 171-179.
- Somani,S.M., Teece,R.G. and Scheaffer,D.J. (1980) Identification of cocarcinogens and promoters in industrial discharges into and in the Illinois River. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **6**, 315-331.
- St. John,M.A.R. and Xu,T. (1997) Insights from model systems-Understanding human cancer in a fly? *Am. J. Hum. Genet.*, **61**, 1006-1010.
- Torres,C., Creus,A. and Marcos,R. (1998) Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. *Mutat. Res.*, **413**, 191-203.
- van Schaik,N., Grant,A., Rubenchik,I. and Graf,U. (1984) Use of Drosophila test systems for genotoxicity testing of herbal teas. *Immunol. Hematol. Res.*, **3**, 199-202.
- Vargas,V.M.F. (1992) Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 237p.

- Vargas,V.M.F., Motta,V.E.P. and Henriques,J.A.P. (1988) Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (Salmonella/microsome). *Rev. Bras. Genet.*, **11**, 505-518.
- Vargas,V.M.F., Motta,V.E.P. and Henriques,J.A.P. (1993) Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, **319**, 31-45.
- Vargas,V.M.F., Guidobono,R.R., Jordão,C. and Henriques,J.A.P. (1995) Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration / extraction procedures. *Mutat. Res.*, **343**, 31-52.
- Vargas,V.M.F., Migliavacca, S.B., Melo, A.C., Horn, R.C, Guidobono, R.R., Sá Ferreira, I.C.F. and Pestana, M.H.D. (2001) Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.*, **490**, 141-158.
- White,P.A., Rasmussen,J.B. and Blaise,C. (1996) Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. *Environ. Mol. Mutagen.*, **27**, 116-139.
- White,P.A. and Rasmussen,J.B. (1998) The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.*, **410**, 223-236.
- Woo,Y-T. and Arcos,J.C. (1981): Environmental Chemicals. In: Sontag,J.M. (ed), Carcinogens in Industry and the Environment, Marcel Dekker, Inc., New York pp 167-282.
- Zeng,D. and Lin,Q. (1999) Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China. *Mutat. Res.*, **426**, 159-161.