

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**IMPACTO GENOTÓXICO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO DO
RIO SUBAÉ (BA) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *D. melanogaster***

Alexandre Azenha Alves de Rezende

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia - MG
Dezembro – 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**IMPACTO GENOTÓXICO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO DO
RIO SUBAÉ (BA) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *D. melanogaster***

Alexandre Azenha Alves de Rezende

**Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
Instituto de Genética e Bioquímica**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia - MG
Dezembro – 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**IMPACTO GENOTÓXICO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO DO
RIO SUBAÉ (BA) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *D. melanogaster***

Alexandre Azenha Alves de Rezende

**Prof. Dr. Mário Antônio Spanó
Instituto de Genética e Bioquímica**

Homologado pela coordenação do Curso de Ciências
Biológicas em ___/___/___

Prof^ª Dr^a Cecília Lomônaco de Paula

Uberlândia – MG
Dezembro – 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**IMPACTO GENOTÓXICO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO DO
RIO SUBAÉ (BA) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *D. melanogaster***

Alexandre Azenha Alves de Rezende

Aprovado pela Banca Examinadora em: ___/___/___

Nota: ___

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Prof. Msc. Bruno Lassmar Bueno Valadares

Prof^a Msc. Silmara de Moraes Pantaleão

Uberlândia, 15 de dezembro de 2005

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, pela orientação, dedicação e por me incentivar, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ulrich Graf, do Institute of Toxicology, ETH and University of Zürich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

À Profa. Dra. Lilia Maria de Azevedo Moreira da Universidade Federal da Bahia, Salvador (BA), por ter proporcionado todas as condições necessárias para a coleta das amostras de água e sedimento do Rio Subaé.

Ao Prof. Dr. Luiz Alfredo Pavanin, do Instituto de Química da UFU, pela análise química das amostras de água e sedimento do Rio Subaé.

Aos Profs. Bruno Lassmar Bueno Valadares e Silmara de Moraes Pantaleão por participarem da banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Aos meus pais, Carlos Henrique e Irina, e minha irmã, Camila, pelo amor e apoio de todas as horas, compreensão pelas minhas ausências e por acreditarem em mim.

À Lívia, pelo companheirismo, carinho e força em todos os momentos.

Aos amigos, companheiros do Laboratório de Citogenética e Mutagenese, Bruno, Edson, Neila, Silmara e Zaira, pelo auxílio, discussões científicas e por proporcionarem um ambiente tranquilo e agradável durante toda a realização deste trabalho.

A todos os integrantes do GRUPO PET/BIOLOGIA – UFU, pela convivência, apoio, incentivo, momentos de descontração e ensinamentos que levarei comigo para sempre.

À Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti, pelo exemplo de dedicação e incentivo.

Aos meus amigos da 56^a Turma de Ciências Biológicas, que de alguma forma, contribuíram para meu crescimento ao longo do curso.

Ao Sr. Paulo Roberto Moderno pela assistência técnica no Laboratório de Mutagênese da UFU.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) e recebeu apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Secretaria de Ensino (SESU/MEC)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia-UFU;
- Universidade Federal da Bahia – UFBA.

Purificar o Subaé

“Purificar o Subaé
Mandar os malditos embora
Dona d'água doce quem é?
Dourada rainha senhora
Amparo do Sergimirim
Rosário dos filtros da aquária
Dos rios que deságuam em mim
Nascente primária
Os riscos que corre essa gente morena
O horror de um progresso vazio
Matando os mariscos e os peixes do rio
Enchendo o meu canto
De raiva e de pena”

Caetano Veloso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A POLUIÇÃO CAUSADA PELA MULTINACIONAL PEÑARROYA OXIDE S.A. NO ESTADO DA BAHIA	5
1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS METAIS PESADOS	7
1.3 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL POR MEIO DO TESTE DE DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA EM <i>Drosophila melanogaster</i>	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 LOCAL DE COLETA	14
3.2 ANÁLISE QUÍMICA	14
3.3 TESTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST – SMART)	14
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

Os sedimentos são partículas minerais e orgânicas encontradas no fundo de ecossistemas aquáticos que, além de fornecerem substrato para uma grande variedade de organismos, funcionam como reservatório dos inúmeros contaminantes de baixa solubilidade, desempenhando importante papel nos processos de assimilação, transporte e deposição desses contaminantes, que continuamente ameaçam a saúde e viabilidade da biota aquática (BRIGANTE & ESPINDOLA, 2003; CHEN & WHITE, 2004).

Como a maior parte dos metais pesados que atingem o ambiente aquático depositam-se no sedimento, este, melhor do que a água reflete a extensão da poluição numa dada área. Por isso, o conhecimento da concentração do metal no sedimento proporciona uma melhor avaliação da contaminação por metais pesados (STEVEN et al., 1990 *apud* ALVES et al., 2000).

Alguns contaminantes ambientais causam uma cascata de efeitos biológicos que podem causar danos desde moleculares e até atingir níveis populacionais. Agentes genotóxicos químicos afetam o DNA diretamente, podendo levar ao aparecimento de mutações somáticas ou germinativas, além de efeitos clastogênicos, que resultam em perda de material genético. As mutações somáticas causam danos celulares que se expressam como doenças. Tal estresse reduz a viabilidade, a sobrevivência e o sucesso reprodutivo (BICKHAM, 2002). Muitos dos mutágenos, aos quais as pessoas estão expostas, são componentes de misturas complexas, e parte do câncer humano está associada à exposição a essas misturas (DeMARINI, 1998).

As mutações ocorrem ao acaso. Isto não quer dizer que todos os *loci* sofrem mutações à mesma taxa e que nem todas as mutações imagináveis sejam igualmente prováveis. Nem quer dizer que as mutações independem de efeitos do meio, sendo que existem agentes mutagênicos no ambiente que aumentam essa taxa (FUTUYMA, 1992).

Uma mutação germinativa ocorre em tecidos que formarão as células reprodutivas. Neste caso, a mutação poderá passar à geração seguinte. Uma mutação somática ocorre no tecido somático em desenvolvimento, podendo levar a uma população de células mutantes, todas elas descendentes da célula onde ocorreu a mutação original. Uma população de células idênticas, derivadas assexuadamente de uma célula genitora, é chamada de clone.

Quanto mais cedo em seu desenvolvimento ocorrer o evento mutacional, maior será a ocorrência de células (clones) mutantes. Os clones mutantes podem, às vezes, ser identificados pelo fato de seu fenótipo contrastar visualmente com as células do tipo selvagem em torno. A frequência mutacional é a taxa com que um tipo específico de mutação (ou um mutante) é encontrado em uma população de células ou de indivíduos (SUZUKI et al., 1992).

Mutações germinativas deletérias também produzem esses efeitos. Subseqüentemente, o potencial genético de populações pode ser alterado pela redução da variabilidade genética, aumento de alelos deletérios, ou a fixação de alelos de baixa frequência, quando a população se torna adaptada às novas condições ambientais. Muitos desses efeitos são sub-letais, porém, as implicações para a sobrevivência das populações que habitam áreas sob impacto por longos períodos podem ser profundamente afetadas (BICKHAM, 2002).

Assim sendo, o monitoramento do ambiente aquático é uma atividade importante para prevenir a poluição de águas causada por contaminação química (SAOTOME & HAYASHI, 2003). Os estudos ecotoxicológicos aplicados ao compartimento água/sedimento, tornam-se importantes artifícios para compreender a extensão dos impactos ambientais, utilizando, para isso, organismos vivos que operam como verdadeiros “biosensores” (BRIGANTE et al., 2003).

Em decorrência da extensibilidade dos resultados de toxicidade de determinado organismo teste para um grande número de substâncias presentes no meio natural, os testes de toxicidade são ferramentas importantes para o gerenciamento, manejo e monitoramento de ambientes aquáticos. Também podem ser utilizados para traçar políticas ambientais, criar legislações referentes às emissões de efluentes, calcular riscos ambientais e gerar informações vitais para os setores de vigilância da saúde pública e ambiental (USEPA, 1994).

1.1 A POLUIÇÃO CAUSADA PELA MULTINACIONAL PEÑARROYA OXIDE S.A. NO ESTADO DA BAHIA

A população da cidade de Santo Amaro da Purificação (BA), distante cerca de 100 Km de Salvador, vem sofrendo, por mais de 30 anos, com as conseqüências da poluição e a contaminação pelo chumbo (Pb) e cádmio (Cd), em níveis endêmicos (IDA, 2002).

Uma fundição primária de Pb, subsidiária do grupo multinacional Peñarroya Oxide S.A. (produção anual de 11.000 a 32.000 toneladas de Pb), instalou-se, em 1960, na periferia de Santo Amaro da Purificação, causando intensa poluição (CARVALHO et al., 1983).

Em 1975, REIS (*apud* CARVALHO et al., 1983) constatou que, nas águas do Rio Subaé, nos pontos mais próximos à fábrica, os níveis médios de Cd e Pb eram, respectivamente, de 0,08 e 6 mg/L, ultrapassando os limites máximos permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para águas de Classe II (0,001mg Cd/L e 0,01 mg Pb/L) (BRASIL. Resolução CONAMA, 2005).

Em janeiro de 1998, o Governo do Estado da Bahia implantou o Projeto Bahia Azul, orçado em 600 milhões de dólares, que tinha como objetivo o saneamento básico (água e esgoto) da região do recôncavo baiano. Em setembro de 1998, as obras do Bahia Azul escavaram as ruas próximas à fundição, expondo a camada de escória. A escória revolvida foi deixada nas portas das residências, aumentando o risco de contaminação da população (CARVALHO et al., 2003).

Os trabalhadores da fundição, seus filhos e os moradores de regiões próximas à usina foram afetados, pois o processo metalúrgico adotado pela empresa não previa o controle seguro sobre os efluentes líquidos e gasosos, destacando-se o material particulado emitido pela chaminé da fábrica e os efluentes lançados *in natura* no Rio Subaé. Os filtros instalados na chaminé da fábrica, após embargo das instalações pelo Governo do Estado,

apesar de conter materiais particulados de alta toxicidade, eram removidos e dispostos de forma inadequada, permitindo que funcionários e transeuntes os levassem para dentro das residências e os utilizassem na forma de tapetes e colchões de dormir, aumentando, assim, à exposição a estas substâncias (CARVALHO et al., 1984; SILVANY-NETO et al., 1996).

Em 1989, a empresa foi adquirida por um grupo industrial brasileiro e, em dezembro de 1993, encerrou suas atividades. O ministério público do Estado da Bahia atualmente move ações contra a empresa poluidora, junto à Comarca de Santo Amaro da Purificação, exigindo o reparo da poluição ambiental. Esse passivo inclui 230 trabalhadores desempregados e cerca de 500.000 toneladas de resíduo industrial sólido (escória) espalhadas pela área da empresa e pela cidade de Santo Amaro. O passivo ambiental da fundição, que possui cerca de 2 a 3% de Pb e até 21% de Cd, foi utilizado por trabalhadores e pela prefeitura de Santo Amaro da Purificação para pavimentar vias de acesso e os quintais das casas. Grandes pilhas de escória foram deixadas a céu aberto e em contato direto com o solo, colocando em risco o próprio solo, as águas subterrâneas e, sobretudo, o Rio Subaé, que atravessa o terreno dessa antiga fundição (SILVANY-NETO, 1989; IDA, 2002).

1.2 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS METAIS PESADOS

As contaminações por metais pesados, como por exemplo Pb e Cd, possuem caráter cumulativo no ecossistema, uma vez que os metais não são totalmente eliminados pelas vias metabólicas comuns, passando a ser acumulados nos organismos. Em seres humanos, os pêlos do corpo servem como depósito, refletindo com maior fidelidade a contaminação do que amostras de sangue e urina, nos quais esses agentes podem estar em constante fluxo metabólico (CARVALHO et al., 1989).

Em termos biológicos, o Cd não é um metal essencial. Além disso, pode apresentar alto potencial tóxico e causar envenenamento se for ingerido por meio de alimentos ou bebidas contaminadas (USEPA, 1976). Apresenta, ainda, propriedades similares às do zinco, competindo com este em diversas reações enzimáticas, podendo deslocá-lo e ligar-se aos sítios ativos de forma irreversível. Esse metal ainda causa disfunção tubular renal e osteoporose (AOSHIMA et al., 1988a, 1988b).

Efeitos genotóxicos do Cd têm sido amplamente descritos na literatura especializada (SHIMADA et al., 1998; STOHS et al., 2001, HARTWIG & SCHWERDTLE, 2002; LIU et al., 2002; HANAHAN & WEINBERG, 2000), assim como danos irreversíveis à célula, que podem levar à apoptose (SHIMODA et al., 2003).

As manifestações decorrentes da contaminação por Pb são, a princípio, pouco evidentes. Com o tempo, o Pb pode danificar o cérebro, o sangue, os nervos, os rins e os órgãos reprodutivos. Isto pode causar incapacidades graves, incluindo perda de memória, fadiga extrema, problemas emocionais, insuficiência renal, coma e morte (www.coshnetwork.org/PB%20E%20O%20PINTOR%20DE%20CASAS.pdf, 2005).

Os efeitos genotóxicos do Pb têm sido descritos por Roy & Rossman (1992); Yesilada (2001); Cestari et al. (2004), Minozzo et al. (2004), Xie et al. (2005) e outros.

Revisões sobre os mecanismos celulares e moleculares da carcinogênese induzida pelo Cd e Pb são apresentadas, respectivamente, por Waisberg et al. (2003) e Silbergeld (2003).

1.3 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL POR MEIO DO TESTE DE DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA EM *Drosophila melanogaster*

Nos últimos anos tem havido um esforço mundial para reduzir o emprego de animais superiores nos testes e pesquisas toxicológicas. Maior ênfase tem sido dada no desenvolvimento de modelos alternativos *in vivo*. A *D. melanogaster* é um inseto modelo muito bem estabelecido, que tem sido utilizado extensivamente para estudos genéticos e de biologia do desenvolvimento. A *Drosophila* tem sido recomendada pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) como um modelo apropriado para testes e pesquisas (FESTING et al., 1998; BENFORD et al., 2000) e, na última década, a *Drosophila* tem emergido como um dos modelos mais poderosos para doenças humanas (AULUCK et al., 2002; KAAZANTSEV et al., 2002) e para pesquisas toxicológica (GAIVAO et al., 1999; KAR CHOWDHURI et al., 1999; MUKHOPADHYAY et al., 2003; NAZIR et al., 2003) (*apud* SIDDIQUE et al., 2005).

A *D. melanogaster* tem sido empregada, com sucesso, na demonstração do potencial genotóxico de lixo sólido industrial (SIDDIQUE et al., 2005); de partículas aéreas (GRAF & SINGER, 1992; DELGADO-RODRIGUEZ et al., 1995; 1999), assim como de corpos d'água (SILVA, 1999; AMARAL et al., 2005; PANTALEÃO et al., 2005).

O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test - SMART*) em células de asa de *Drosophila melanogaster*, desenvolvido por Graf et al. (1984; 1989) e por Graf & van Schaik (1992) tem sido empregado em testes de genotoxicidade e biomonitoramento de corpos d'água, por ter a capacidade de discriminar agentes mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos (SILVA, 1999; AMARAL et al., 2005; PANTALEÃO et al., 2005).

Este teste é realizado por meio de cruzamentos experimentais utilizando três linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr³*, 3-38,8): [1] linhagem “*multiple wing hairs*” (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem “*flare-3*” (*flr³*), com constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{3+e} e Bd^S*; [3] linhagem “*ORR; flare-3*” (*ORR; flare-3*), com constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{3+e} e Bd^S* (GRAF & VAN SCHAİK, 1992), sendo esta última, portadora de genes de expressão elevada de enzimas do complexo citocromo P450, localizados nos cromossomos 1 e 2, provenientes da linhagem *Oregon R*, resistente ao DDT.

Com estas linhagens são realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*”; 2) cruzamento de alta bioativação (HB - *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*ORR; flr³*”. Assim sendo, o cruzamento padrão é útil na detecção de agentes genotóxicos diretos, enquanto o cruzamento de alta bioativação é útil na detecção de agentes genotóxicos indiretos, ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos ou agentes que podem ser inibidos pelo metabolismo.

Ambos cruzamentos produzem dois tipos de progênie: 1) Trans-heterozigoto marcado (*mwh + / + flr³*) (MH), que é distinguido pela borda lisa da asa; B) Heterozigoto balanceado (*mwh + / TM3, Bd^S*) (BH), com borda de asa serrilhada.

Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “*mwh*” ou “*flare*”, ou como manchas gêmeas mostrando áreas adjacentes “*mwh*” e “*flare*”. As manchas simples são produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção), recombinação, ou não-disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação. Nos indivíduos BH as

manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “*mwh*”, produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou não-disjunção. A indução da perda de heterozigose destes marcadores, nas células dos discos imaginais da larva, por tratamento com um composto genotóxico, leva à formação de clones de células mutantes, os quais se expressam, após a metamorfose, em uma mancha mutante na asa (SPANÓ & GRAF, 1998).

Sendo o Brasil um país cuja bacia hidrográfica é extensa, fazem-se necessárias mais investigações relativas à qualidade de suas águas. Neste sentido, o presente estudo aponta para as possibilidades de aplicação de metodologias viáveis para mensuração da qualidade das águas. Além disso, possibilita propor medidas de controle e, apontar soluções que garantam a qualidade de vida da população e da biota aquática, principalmente em regiões comprovadamente impactadas por dejetos antropogênicos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o potenciais genotóxico de amostras de água e sedimento do Rio Subaé (BA), por meio do teste de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a indução de mutação, aberração cromossômica, recombinação e não-disjunção cromossômica em descendentes trans-heterozigotos marcados, provenientes de cruzamentos padrão e de alta bioativação metabólica;
- Avaliar a indução de mutação, aberração cromossômica e não-disjunção cromossômica em descendentes heterozigotos balanceados, provenientes de cruzamentos padrão e de alta bioativação metabólica;
- Avaliar e quantificar o porcentual de alterações genéticas devidas exclusivamente à recombinação somática, em descendentes de ambos cruzamentos;
- Avaliar a influência da ativação metabólica, pelo complexo enzimático citocromo P450, de agentes xenobióticos presentes nestas amostras;
- Avaliar a presença de Pb e Cd, bem como as concentrações dos mesmos.;

- Correlacionar a concentração dos metais pesados nas amostras de água e sedimento com eventuais alterações genéticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE COLETA

Foram coletadas, no dia 4 de fevereiro de 2004, amostras de água e sedimento do Rio Subaé (Estado da Bahia), região nordeste do Brasil, 12°15' e 12°40' latitude Sul e 38°37' e 39°00' longitude Oeste, impactado especialmente por resíduos de fábricas de celulose e lingotes de chumbo, agrotóxicos utilizados nos canaviais e nas culturas de hortaliças, bem como esgotos domésticos. O local de coleta está mostrado na Figura 1.

As amostras foram coletadas de acordo com Vargas et al. (1993) e Amaral et al. (2005), sendo mantidas refrigeradas até o dia do tratamento.

3.2 ANÁLISE QUÍMICA

As amostras de água e sedimento foram submetidas à análise para detecção de metais pesados (Pb e Cd) por meio de espectrometria de absorção atômica. As análises foram realizadas nos laboratórios do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

3.3 TESTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST – SMART)

O teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster* (SMART) foi desenvolvido de acordo com o descrito por GRAF et al. (1984; 1989) e GRAF & VAN SCHAİK (1992).

Foram utilizadas três linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr³*, 3-38,8): [1] linhagem “multiple wing hairs” (“mwh”) com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem “flare³” (“flr³”), com constituição genética *flr³/ In(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{3+e} e Bd^δ*; e [3] linhagem “ORR; flare³” (“ORR; flare³”), com constituição genética *ORR; flr³/ In(3LR)TM3, ri p^o sep l(3)89Aa bx^{3+e} e Bd^δ*. Todas essas linhagens mutantes foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ulrich Graf, do *Institute of Toxicology, ETH, University of Zürich, Schwerzenbach, Suíça*.

As linhagens mutantes foram mantidas em estufa B.O.D (Biologic Oxygen Demand) (Tecnal – Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e temperatura de 25±1°C.

Foram realizados dois cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*), no qual machos “mwh” foram cruzados com fêmeas virgens “flare³” (GRAF et al., 1989); 2) cruzamento de alta bioativação (HB - *high bioactivation cross*), machos “mwh” cruzados com fêmeas virgens “ORR; flare³” (GRAF & VAN SCHAİK, 1992). Os ovos obtidos de ambos cruzamentos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento suplementado com sacarose. Larvas de 3º estágio (72 ± 4 h), provenientes de ambos cruzamentos, foram lavadas com água corrente, seguida de água destilada estéril e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Em seguida, foram submetidas a tratamento crônico (aproximadamente 48 horas) com amostras de água (*in natura*) e sedimento do Rio Subaé.

Os tratamentos com a água do Rio Subaé foram realizados em frascos contendo 1,5g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki Hikari®) e 5mL de

água do rio. Os tratamentos com sedimento foram realizados em frascos contendo diferentes proporções (1:5; 1:2 e 1:1) de sedimento vs. meio de cultura alternativo – purê de batata instantâneo Yoki Hikari®). Como controle negativo foi utilizada água MilliQ (Millipore, Vimodrone, Milão, Itália). Como controle positivo, uretano (10 mM). Todos os tratamentos foram realizados em frascos âmbar, para proteger contra a fotodegradação.

Os descendentes trans-heterozigotos marcados ($mwh + / + flr^3$) (MH) e heterozigotos balanceados ($mwh + / TM3, Bd^S$) (BH), foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas foram extraídas com auxílio de lupa e pinças entomológicas nº5 e montadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50ml de água) e analisadas quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, com aumento de 400 vezes. Durante a análise das lâminas, foram registrados o número de manchas mutantes, assim como o tipo e o tamanho das mesmas.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada de acordo com o teste do X^2 para proporções, bicaudal, com nível de significância: $\alpha=\beta=0,05$ de acordo com Frei & Würigler, 1988.

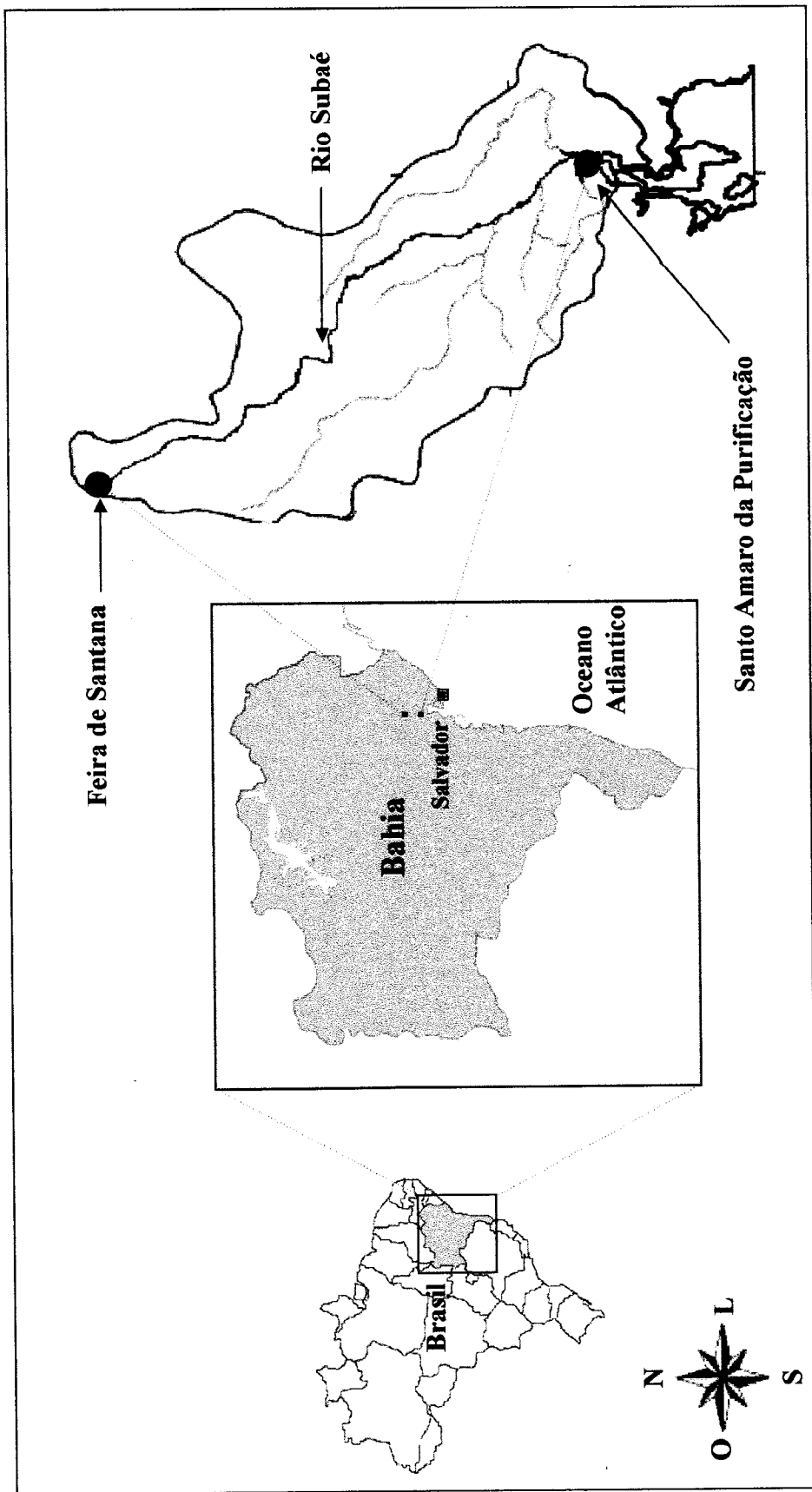


Figura 1. Mapa do Brasil com Estado da Bahia mostrando a localização geográfica e a bacia hidrográfica do Rio Subaé.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com água (*in natura*) e sedimento (1:5, 1:3 e 1:1) coletados no Rio Subaé e os controles negativo (água MilliQ) e positivo (uretano 10 mM) estão apresentados na Tabela 1.

Os números de manchas mutantes simples pequenas e o total de manchas observados nos tratados com a água do Rio Subaé diferiram significativamente ($\alpha < 0,05$) quando comparados com os números de manchas mutantes encontrados no controle negativo.

Os números de manchas simples pequenas, simples grandes e o total de manchas observados nos tratados com uretano 10 mM diferiram significativamente ($\alpha < 0,05$) quando comparados com os números de manchas mutantes observados no controle negativo.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes BH do cruzamento ST, tratados com água (*in natura*) do Rio Subaé e água MilliQ (controle negativo) estão apresentados na Tabela 1. As freqüências de manchas mutantes registradas nos descendentes BH tratados com água do Rio Subaé não diferiram estatisticamente das freqüências observadas no controle negativo.

Os descendentes BH possuem múltiplas inversões no cromossomo balanceador *TM3*, fazendo com que todos os eventos recombinacionais sejam eliminados. Assim sendo, comparando-se as freqüências de manchas observadas nos descendentes MH (devidas à mutação, aberração e recombinação), com as freqüências de manchas observadas nos descendentes BH (devidas somente à mutação e aberração), é possível estimar a freqüência de manchas devida à recombinação.

Comparando-se as freqüências de manchas observadas nos descendentes MH e BH do cruzamento ST, tratados com água do Rio Subaé, verifica-se que 15% das manchas foram induzidas por mutação e aberração cromossômica, enquanto que 85% foram induzidas por recombinação.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com sedimento (1:5, 1:3 e 1:1) coletado no Rio Subaé, estão apresentados na Tabela 1. As freqüências de todas as categorias de manchas mutantes não diferiram estatisticamente ($\alpha > 0,05$) quando comparados com o número de manchas mutantes encontrado no controle negativo.

Diante dos resultados negativos encontrados nos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com sedimento (1:5, 1:3 e 1:1) coletado no Rio Subaé, não se justifica a análise dos descendentes BH.

A Figura 2 apresenta a distribuição do tamanho de manchas mutantes observadas nos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com água MilliQ, sedimento (1:5, 1:3 e 1:1), água do Rio Subaé e uretano (10 mM).

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento HB, tratados com água (*in natura*) e sedimento (1:5, 1:3 e 1:1) coletados no Rio Subaé e os controles negativo (água MilliQ) e positivo (uretano 10 mM) estão apresentados na Tabela 2.

Os números de todas as categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes, gêmeas e o total de manchas) observados nos tratados com a água do Rio Subaé diferiram significativamente ($\alpha < 0,05$) quando comparados com o número de manchas mutantes encontrado no controle negativo.

Os números de manchas simples pequenas e o total de manchas observados nos tratados com uretano (10 mM) diferiram significativamente ($\alpha < 0,05$) quando comparados com os números de manchas mutantes observados no controle negativo.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes BH do cruzamento HB, tratados com água (*in natura*) do Rio Subaé e com água MilliQ (controle negativo) estão apresentados na Tabela 2. As freqüências de manchas mutantes registradas nos descendentes BH tratados com água do Rio Subaé não diferiram estatisticamente ($\alpha > 0,05$) das freqüências observadas no controle negativo.

Comparando-se as freqüências de manchas observadas nos descendentes MH e BH do cruzamento HB, tratados com água do Rio Subaé, verifica-se que 11% das manchas foram induzidas por mutação e aberração cromossômica, enquanto que 89% foram induzidas por recombinação.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH do cruzamento HB, tratados com sedimento (1:5, 1:3 e 1:1) coletado no Rio Subaé, estão apresentados na Tabela 2. As freqüências de todas as categorias de manchas mutantes não diferiram estatisticamente ($\alpha > 0,05$) quando comparados com o número de manchas mutantes encontrado no controle negativo.

A Figura 3 apresenta a distribuição do tamanho de manchas mutantes observadas nos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com água MilliQ, sedimento (1:5, 1:3 e 1:1), água do Rio Subaé e uretano (10 mM).

A Figura 4 apresenta as porcentagens de manchas mutantes induzidas pela água do Rio Subaé, nos descendentes de ambos cruzamentos, devidas à mutação e à recombinação.

TABELA I. Resultados obtidos no teste da mancha da asa (SMART) com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) tratados com água e sedimento do Rio Subaé (BA)

Tratamento	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico estatístico*						Total manchas m=2	Manchas com clones <i>mwh</i>
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) m=2	Manchas simples grandes (> 2 céls) m=5	Manchas gêmeas m=5	Manchas simples m=2	Manchas gêmeas m=5	Manchas simples m=2		
<i>mwh/flr</i>³									
Controle positivo	50	1,36 (68) +	0,30 (15) +	0,04 (02) i	1,70 (85) +	85			
Controle negativo	50	0,26 (13)	0,02 (01)	0,02 (01)	0,30 (15)	15			
Água do Rio Subaé	50	0,92 (46) +	0,12 (06) i	0,10 (05) i	1,14 (57) +	51			
Sedimento 0,25 g	50	0,28 (14) i	0,02 (01) i	0,02 (01) i	0,32 (16) i	16			
Sedimento 0,50 g	50	0,20 (10) -	0,08 (04) i	0,02 (01) i	0,30 (15) -	15			
Sedimento 0,75 g	50	0,18 (09) -	0,04 (02) i	0,00 (00) i	0,22 (11) -	11			
<i>mwh/TM3</i>									
Controle negativo	40	0,10 (04)	0,00 (00)		0,10 (04)	4			
Água do Rio Subaé	40	0,15 (06) i	0,00 (00) i		0,15 (06) i	6			

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler [1988, 1995] para comparação com o correspondente controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo ($P < 0.05$); m, fator de multiplicação para avaliação de resultados negativos.

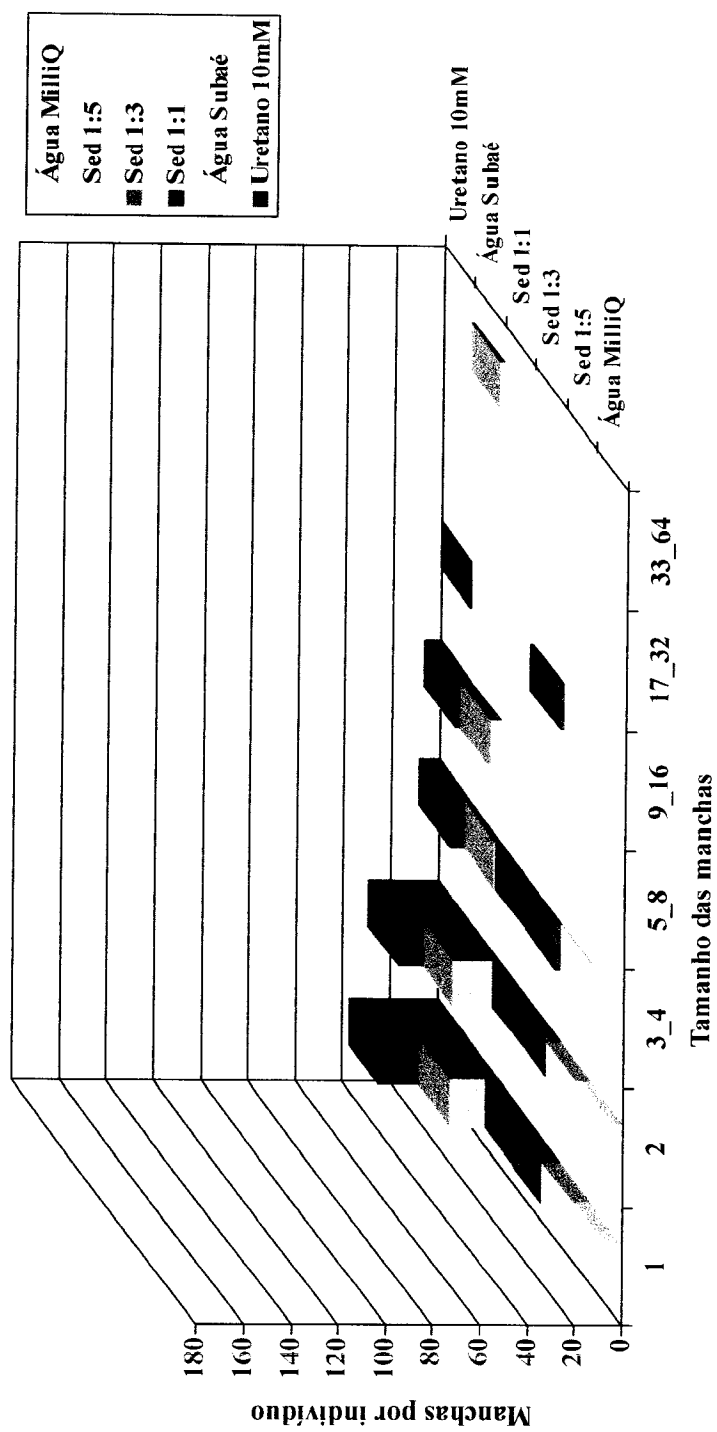


Figura 2. Distribuição do tamanho (número de células) de manchas mutantes em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) provenientes do cruzamento padrão (ST) tratados com água MilliQ (controle negativo), sedimento (1:5, 1:3 e 1:1 g de sedimento/ g de puré de batata instantâneo) e água (*in natura*) do Rio Subaé (BA) e uretano 10 mM (controle positivo).

TABELA 2. Resultados obtidos no teste da mancha da asa (SMART) com os descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) do cruzamento de alta capacidade de biotivação (HB) tratados com água e sedimento do Rio Subaé (BA)

Tratamento	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas) diagnóstico estatístico*						Total manchas m=2	Manchas com clones <i>mw/h</i>
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) m=2	Manchas simples grandes (> 2 céls) m=5	Manchas gêmeas m=5	Manchas simples m=2	Manchas gêmeas m=5	Manchas simples m=2		
<i>mw/h/T1r</i>									
Controle positivo	50	4,96 (248) +	0,28 (14) i	0,10 (05) i	5,34 (267) +			267	
Controle negativo	50	0,74 (37)	0,16 (08)	0,04 (02)	0,94 (47)			45	
Água do Rio Subaé	50	2,02 (101) +	0,42 (21) +	0,24 (12) +	2,68 (134) +			129	
Sedimento 0,25 g	50	0,36 (18) -	0,10 (05) -	0,00 (00) i	0,46 (23) -			21	
Sedimento 0,50 g	50	0,64 (32) -	0,04 (02) -	0,04 (02) i	0,72 (36) -			35	
Sedimento 0,75 g	50	0,92 (46) -	0,18 (09) i	0,16 (08) i	1,26 (63) -			58	
<i>mw/h/TM3</i>									
Controle negativo	40	0,13 (05)	0,00 (00)		0,13 (05)			5	
Água do Rio Subaé	40	0,25 (10) i	0,03 (01) i		0,28 (11) i			11	

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler [1988, 1995] para comparação com o correspondente controle: -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo ($P < 0.05$); m, fator de multiplicação para avaliação de resultados negativos.

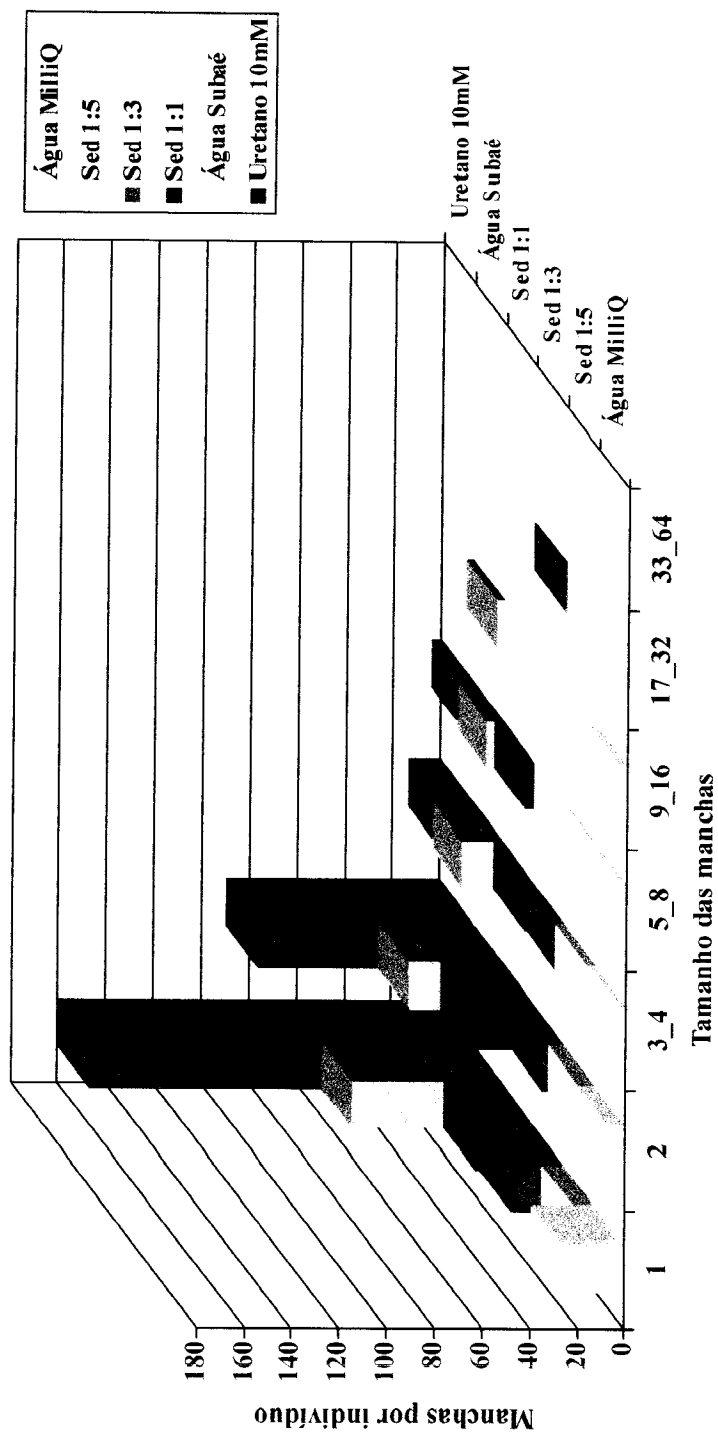


Figura 3. Distribuição do tamanho (número de células) de manchas mutantes em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) provenientes do cruzamento de alta bioativação (HB) tratados com água MilliQ (controle negativo), sedimento (1:5, 1:3 e 1:1 g de sedimento/ g de purê de batata instantâneo) e água (*in natura*) do Rio Subaé (BA) e uretano 10 mM (controle positivo).

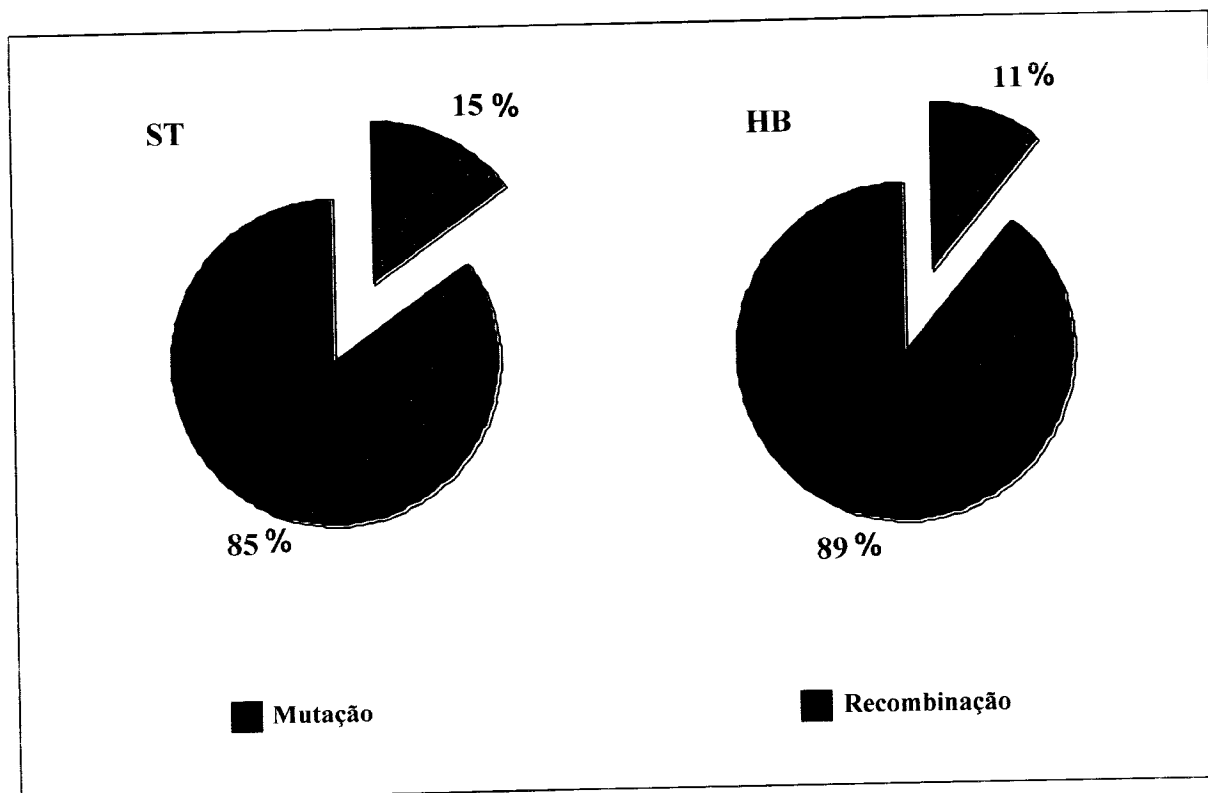


Figura 4. Porcentagens de manchas mutantes induzidas pela água do Rio Subaé, nos descendentes heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos ST e HB, devidas à mutação e à recombinação.

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que aplica o *SMART* de asa na avaliação da genotoxicidade da água e do sedimento do Rio Subaé.

Foram observados aumentos estatisticamente significativos nas freqüências de manchas simples pequenas e no total de manchas nos descendentes MH do cruzamento ST; e aumentos estatisticamente significativos nas freqüências de todas as categorias de manchas nos descendentes MH do cruzamento HB, tratados com água do Rio Subaé, quando comparados com os respectivos controles negativos.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na freqüência de manchas gêmeas induzidas pela água do Rio Subaé nos indivíduos MH do cruzamento ST, quando comparado com o número de manchas gêmeas observadas no controle negativo. No entanto, no cruzamento HB, o aumento observado na freqüência dessas manchas foi estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo. Isto pode ser explicado pelo fato de o cruzamento HB, por possuir níveis elevados de enzimas citocromo P450, fazer com que o *SMART* seja mais sensível à detecção de promutágenos e procarcinógenos.

Nos indivíduos MH, manchas mutantes (*mwh* ou *flr*) podem ser produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção), recombinação e não disjunção. A presença de manchas gêmeas demonstra a ocorrência de recombinação mitótica entre o centrômero e o locus "flare". No entanto, apenas por este parâmetro, não é possível quantificar a contribuição de cada um desses mecanismos no total de manchas mutantes. Para tanto, faz-se necessário a análise dos descendentes BH, nos quais as manchas mutantes são devidas apenas à mutação, aberração cromossômica (deleção) e não disjunção. Devido à inversão

presente no cromossomo balanceador TM3, todos os eventos recombinacionais são eliminados. Assim sendo, a frequência de manchas mutantes observada na análise dos descendentes BH, comparada com a frequência de manchas mutantes observada na análise dos descendentes MH permite quantificar a contribuição de eventos recombinacionais no total de manchas observadas (GRAF et al., 1984).

Na análise dos indivíduos BH dos cruzamentos ST e HB não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências de manchas mutantes simples pequenas, simples grandes e no total de manchas induzidas pela água do Rio Subaé, quando comparado com os números de manchas observadas nos respectivos controles negativos.

Os resultados das análises das frequências de manchas observadas nos descendentes MH, comparados com os observados nos descendentes BH permitiram concluir que, a amostra de água coletada do Rio Subaé apresentava genotoxinas com alto poder de recombinação (85% e 89%, respectivamente, nos descendentes dos cruzamentos ST e HB - Figura 4).

Evidências recentes têm sugerido que as alterações cromossômicas, mutações e principalmente a recombinação são os principais riscos genéticos envolvidos na gênese e progressão do câncer, uma vez que estes eventos levam à perda de heterozigose de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (BISHOP & SCHIELST, 2003).

As distribuições dos tamanhos de manchas observadas nas Figuras 2 e 3 estão de acordo com o observado em experimentos anteriores (GRAF et al., 1984; FRÖLICH & WÜRGLER, 1990; SPANÓ et al., 2001) que demonstram que tratamentos crônicos de 48 h resultam em distribuições onde manchas menores predominam e as frequências de manchas maiores decrescem de acordo com o aumento de tamanho.

Os resultados obtidos nos tratamentos com água do Rio Subaé são similares aos obtidos na análise de amostras de água do Rio Caí, do Estado do Rio Grande do Sul, impactado por mistura complexa proveniente de esgotos municipais, assim como despejos de diferentes indústrias, quando testadas por meio dos cruzamentos ST e HB do *SMART* de asa de *D. melanogaster* (AMARAL et al., 2005).

Esses resultados ainda estão de acordo com os obtidos por YESILADA (2001), que testou o nitrato de Pb ($Pb(NO_3)_2$), nas concentrações de 1 e 10 mM, em descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento ST do *SMART*, e verificou a ocorrência de aumento estatisticamente significativo nas frequências de manchas mutantes pequenas simples, pequenas grandes e no total de manchas. Além disso, foi verificado que a taxa de sobrevivência foi 54,67% e 27,85% para os tratados, respectivamente, com 1 e 10 mM, o que demonstra a alta toxicidade do $Pb(NO_3)_2$.

O rio Subaé está impactado por mistura complexa oriunda de despejos domésticos e industriais que, de acordo com OHE et al. (2003), pode conter agentes nocivos ao material genético. Uma revisão sobre o impacto genotóxico de despejos domésticos e industriais em corpos d'água é apresentado por White & Rasmussen (1998) demonstrando que estes são importantes fontes de contaminantes ambientais. No entanto, uma grande proporção dos danos genéticos é comprovadamente devida à contaminação ambiental por Cd e Pb, provocada pela multinacional Peñarroya Oxide S.A. uma vez que, a escória amontoada nas dependências da fábrica, distante apenas 290 metros da margem, em local com declive topográfico em direção ao curso do rio, é transportada, por gravidade, ao lençol freático ou para o curso do rio (IDA, 2002).

Trabalhos de genotoxicidade com Cd e Pb em outros organismos testes têm demonstrado que o Cd pode ocasionar quebra da fita do DNA, troca entre cromátides irmãs

e aberrações cromossômicas (SHIMADA et al., 1998; STOHS et al., 2001), inibir o sistema de reparo do DNA e causar instabilidade genômica (HARTWIG & SCHWERDTLE, 2002; LIU et al., 2002), inibir a defesa contra o estresse oxidativo, induzir ativação de proto-oncogenes (HANAHAN & WEINBERG, 2000), assim como causar danos irreversíveis à célula, podendo levar à apoptose (SHIMODA et al., 2003).

O Pb induz mutação no gene *gpt* de hamster Chinês da linhagem V79 (ROY & ROSSMAN, 1992); mutação, aberração e recombinação gênica em *D. melanogaster* (YESILADA, 2001); aberrações cromossômicas em peixes *Hoplias malabaricus* (CESTARI et al., 2004), aberrações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos do sangue periférico de trabalhadores (MINOZZO et al., 2005), quebras de cadeias duplas de DNA em células de pulmão humano (XIE et al., 2005), etc., além de causar danos oxidativos no DNA e substituir o zinco em vários complexos enzimáticos como, por exemplo, na regulação da transcrição (SIBERGELD et al., 2003).

O Pb e o Cd são considerados importantes carcinógenos humanos. Revisões sobre os mecanismos celulares e moleculares da carcinogênese induzida por esses metais pesados são apresentadas, respectivamente, por Waisberg et al. (2003) e Silbergeld (2003).

Não foram observados aumentos estatisticamente significativos nas frequências de todas as categorias de manchas analisadas nos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, tratados com sedimento do Rio Subaé, em todas as proporções de sedimento/meio de cultura alternativo, quando comparados com os respectivos controles negativos. Isto pode estar relacionado com o tamanho das partículas que compõe o sedimento. Elas podem ser maiores do que as larvas podem ingerir, portanto, é necessária a medida do tamanho das mesmas.

Foi observado um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes simples pequenas e no total de manchas induzidas pelo uretano (10 mM) nos descendentes MH do cruzamento ST, enquanto que no cruzamento HB o uretano induziu aumento estatisticamente significativo na frequência de todas as categorias de manchas mutantes, quando comparado com os respectivos controles negativos.

Esses dados estão de acordo com trabalhos preliminares (FRÖLICH & WÜRGLER, 1990), que mostram que o uretano possui um claro potencial genotóxico em *D. melanogaster*, com forte dependência da ativação metabólica, dependente de citocromo P450.

Os resultados obtidos nos tratamentos com uretano validam os resultados negativos obtidos nos tratamentos com sedimento, demonstrando a eficácia das linhagens mutantes utilizadas, uma vez que todos os experimentos foram realizados concomitantemente.

Embora as genotoxinas presentes na água e no sedimento do Rio Subaé não terem sido extensivamente caracterizadas neste estudo, foi possível avaliar que a concentração de Cd presente na água como sendo de 0,06 mg/L, e as de Pb iguais a 0,29 e 56,4 mg/L na água e no sedimento, respectivamente. Não foi detectado Cd no sedimento.

As principais fontes desses elementos para o ambiente aquático são o intemperismo das rochas que compõem a bacia de drenagem e a erosão de solos ricos nesses materiais. Atualmente, além das fontes naturais de metais, as fontes antrópicas têm-se destacado como responsáveis pelos elevados níveis desses elementos nos corpos d'água, colocando em risco o equilíbrio ecológico desses sistemas (ESTEVES, 1988).

Por meio de análise comparativa, que permite avaliar o grau de alteração nos níveis desses metais na água, os valores desses elementos encontrados na água do Rio Subaé foram confrontados com concentrações-limites definidas pela Resolução 20/2005 do

Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Foi possível concluir que, as concentrações de Cd e Pb observadas nas amostras de água e sedimento do Rio Subaé estão, respectivamente, 60 e 10 vezes, acima das concentrações permitidas (0,001 mg Cd/L; 0,01mg Pb/L) (CONAMA, 2005).

A medida pura e simples da concentração total de um constituinte químico no sedimento, nem sempre é um indicativo do nível do efeito tóxico. A toxicidade do metal no sedimento depende de quanto deste metal está disponível para bioacumulação.

Apesar da alta concentração de Pb detectada no sedimento do Rio Subaé, os resultados negativos observados neste trabalho nos permitem supor que, provavelmente, o Pb não esteja biodisponível no ambiente, uma vez que, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997), metais bivalentes, como Pb, Cd, Zn, Cu, Ni e Mg, reagem com sulfetos, formando compostos altamente insolúveis e que não são biodisponíveis.

Devido ao fato de as relações entre a concentração total de contaminantes no sedimento e a concentração biodisponível serem ainda pouco entendidas, a determinação dos efeitos de sedimentos contaminados sobre organismos aquáticos requerem testes laboratoriais adicionais de toxicidade e bioacumulação (USEPA, 1994).

Portanto, é possível o sedimento estar contaminado por metal, mas não apresentar efeito tóxico/genotóxico. Isto vai depender dos processos geoquímicos que controlam a disponibilidade do metal no sedimento. Concentrações similares de produtos químicos podem produzir efeitos biológicos diferentes em sedimentos diferentes. Esta discrepância ocorre porque a toxicidade depende do grau de ligação entre o contaminante e constituintes do sedimento que controlam a biodisponibilidade.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que, nas condições experimentais utilizadas:

- a água do Rio Subaé possui agentes genotóxicos diretos e indiretos (dependentes da ação metabólica mediada por enzimas do complexo citocromo P450) com alta capacidade de recombinação somática.
- a água e o sedimento do Rio Subaé estão contaminados com concentrações de Cd e Pb acima do permitido pela Resolução CONAMA/2005.
- o sedimento, devido a suas características físico-químicas, caracteriza-se como uma fonte perigosa de contínua contaminação ambiental.
- o *SMART* de asa de *D. melanogaster* é um instrumento sensível para a detecção de agentes genotóxicos em misturas complexas de origem ambiental.

Diante do acima exposto, faz-se necessário o estabelecimento de políticas de saneamento básico assim como de biomonitoramento contínuo da bacia hidrográfica do Rio Subaé, com o objetivo de proteger a biota aquática e a população ribeirinha.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, J. P. H.; OLIVEIRA, A. P. C.; MELO, R. P. A. Metais pesados em sedimentos do rio Japaratinga. **Cadernos UFS: Química & Meio Ambiente**, v.2, p.21-33, 2000.
2. AMARAL, V. S.; DA SILVA, R. M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. *Drosophila* wing - spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. **Mutation Research**, v.583, p.63-74, 2005.
3. ANDRADE V. M.; SILVA J.; SILVA, F. R.; HEUSER V. D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; FREITAS, T. R. O. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p.459-468, 2004.
4. AOSHIMA, K.; IWATA, K.; KASUYA, Y. Environmental exposure to cadmium and effects on human health. Part I: Renal tubular function in inhabitants of the cadmium-polluted Jinzu river basin in Toyama Prefecture. **Japanese Journal of Medicine**, v.43, p.864-871, 1988a.
5. AOSHIMA, K.; IWATA, K.; KASUYA, Y. Environmental exposure to cadmium and effects on human health. Part II: Bone and mineral metabolism in inhabitants of the cadmium-polluted Jinzu river basin in Toyama Prefecture. **Japanese Journal of Medicine**, v.43, p.949-955, 1988b.
6. ARINÇ, E. & SEN, A. Hepatic cytochrome P4501A and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in mullet and common sole as an indicator of toxic pollution in Izmir Bay, Turkey. **Marine Environmental Research**, v.48, p.147-160, 1999.
7. AVISHAI, N.; RABINOVITZ, C.; MOISEEVA, E.; RINKEVICH, B. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. **Mutation Research**, v.518, p. 21-37, 2002.
8. BARIENĖ, J.; LAZUTKA, J.; ŽYVOKIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; BAGDONAS, E.; BJORNSTAD, A.; ANDERSEN, O. K. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. **Environmental Toxicology**, v.19, p.365-371, 2004.

9. BICKHAM, J. W. Genetic effects of environmental contaminants: From molecules to populations. **Mutagenesis**, v.17, p.552, 2002.
10. BISHOP, A. J. R. & SCHIELST, R. H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, p.94-105, 2003.
11. **BRASIL, 2005. Resolução CONAMA nº 357**, de 17 de março de 2005.
12. BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, L. G. Limnologia fluvial - Um estudo no Rio Mogi-Guaçu, São Carlos: Rima, 2003, 278p.
13. CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M. J. ; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v.247, p.295-311, 2000.
14. CARVALHO, F. M.; TAVARES, T. M.; SOUZA, S. P.; LINHARES, P. Absorção e intoxicação por chumbo e cádmio em pescadores da região do Rio Subaé. **Ciência e Cultura (Revista da SBPC)**, v. 35, p.360-366, 1983.
15. CARVALHO, F. M.; SILVANY – NETO, A. M.; LIMA, M. E. C.; MENDES, J. L. B.; QUAGLIA G. M. C.; TAVARES, T. M. Poluição por cádmio e lesão renal em habitantes de Santo Amaro da Purificação, Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública** v.11, p.116-122, 1984.
16. CARVALHO, F. M.; SILVANY – NETO, A. M.; CHAVES, M. E. C.; MELO, A. M. C.; GALVÃO, A. L.; TAVARES, T. M. Chumbo e cádmio em cabelo de crianças de Santo Amaro da Purificação, Bahia. **Ciência e Cultura (Revista da SBPC)** v.41, p.646-651, 1989.
17. CARVALHO, F. M.; SILVANY – NETO, A. M.; TAVARES, T. M.; COSTA, A. C. A.; CHAVES, C. R.; NASCIMENTO, L. D.; REIS, M. A. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 13, p.19-24, 2003.
18. CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and

- chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, p.270-274, 2004.
19. CHEN, G. & WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v.567, p.151-225, 2004.
 20. DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTÍZ-MARTTELO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GÓMEZ-ARROYO, S. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.341, p. 235-247, 1995.
 21. DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTÍZ-MARTTELO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GÓMEZ-ARROYO, S.; GRAF, U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, v.39, p. 33-43, 1999.
 22. DeMARINI, D. M. Mutation Spectra of complex mixtures. **Mutation Research**, v.411, p.11-18, 1998.
 23. ESTEVES, F. A. Fundamentos em Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 1988, 575p.
 24. EVERARTS, J. M.; DEN BESTEN P. J.; HILLEBRAND, M. T. H. J.; HALBROOK, R. S.; SHUGART, L. R. DNA strand breaks, cytochrome P-450-dependent monooxygenase system activity and levels of chlorinated biphenyl congeners in the pyloric caeca of the seastar (*Asterias rubens*) from the North Sea. **Ecotoxicology**, v. 7, p.69-79, 1998.
 25. FREI, H. & WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, p.297-308, 1988.
 26. FRÖLICH, A. & WÜRGLER, F. E. *Drosophila* wing spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutation Research**, v.234, p.71-80, 1989.
 27. FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**, 2ª. Ed., Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992, 631p.

28. GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p.153-188, 1984.
29. GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989.
30. GRAF, U. & VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67, 1992.
31. HANAHAAN, D. & WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.
32. HARTWIG, A. & SCHWERDTLE, T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. **Toxicology Letters**, v.127, p.47-54, 2002.
33. HORN, R. C.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. **Mutagenesis**, v.19, p. 445 - 451, 2004.
34. IDA - INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO AMBIENTAL. **Poluição por chumbo em Santo Amaro da Purificação. Brasília, 2002. 7p. Relatório.**
35. KATAOKA, H.; HAYATSU, T.; HIETSCH, G.; STEINKELLNER, H.; NISHIOKA, S.; NARIMATSU, S.; KNASMULLER, S.; HAYATSU, H. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and A α C) in the water of the Danube River. **Mutation Research**, v.466, p.27-35, 2000.
36. KILEMADE, M. F.; HARTL, M. G. J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F. N. A. M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N. M. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p.56-64, 2004.

37. LIU, J.; KADIISKA, M. B.; CORTON, J. C.; QU, W.; WAALKES, M. P.; MASON, R. P.; LIU, Y.; KLAASSEN, C. D. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, p.525–535, 2002.
38. MASSACHUSETTS DIVISION OF OCCUPATIONAL SAFETY. Disponível em: <<http://www.coshnetwork.org/%20CHUMBO%20E%20O%20PINTOR%20DE%20OCASAS.pdf>> . Acessado em 01 de junho de 2005.
39. MINOZZO, R.; DEIMLING, L. I.; GIGANTE, L. P.; SANTOS-MELO, R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead. **Mutation Research**, v.565, p.53-60, 2004.
40. PACHECO, M. & SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.64-75, 2001.
41. PANTALEÃO, S. M.; SOUZA, N. C.; VALADARES, B. L. B.; REZENDE, A. A. A.; GUTERRES, Z. R.; SPANÓ, M. A. Presença de agentes genotóxicos diretos na água do rio Japarutuba (SE), sob influência de efluentes (água de produção) gerados por indústria petroquímica. In: **Anais do 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia (SP)** de 07 a 10 de setembro de 2005.
42. RAJAGURU, P.; SUBA, S.; PALANIVEL, M.; KALAISELVI, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.41, p. 85-91, 2003.
43. ROY, N. K. & ROSSMAN, T. G. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. **Mutation Research**, v.298, p.97–103, 1992.
44. SAOTOME, K. & HAYASHI, M. Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality. **Mutagenesis**, v.18, p.73-76, 2003.
45. SHIMADA, H.; SHIAO, Y. H.; SHIBATA, M.; WAALKES, M. P. Cadmium suppresses apoptosis induced by chromium. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.54, p. 159–168, 1998.

46. SHIMODA, R.; ACHANZAR, W. E.; QU, W.; NAGAMINE, T.; TAKAGI, H.; MORI, M.; WAALKES, M. P. Metallothionein is a potent negative regulator of apoptosis. **Toxicological Sciences**, v.73, p.294-300, 2003.
47. SIDDIQUE, H. R.; GUPTA, S. C. O.; DHAWAN, A.O.; MURTHY, R. C. O.; SAXENA, D. K. O.; CHOWDHURI, D. K. Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.46, p.189-197, 2005.
48. SILBERGELD, E. K. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. **Mutation Research**, v.533, p. 121-133, 2003.
49. SILVA, R. M. 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, Brasil, 1999.
50. SILVANY-NETO, A. M.; CARVALHO, F. M.; CHAVES, M. E. C.; BRANDÃO A. M.; TAVARES, T. M. Repeated surveillance of lead poisoning among children. **Science of the Total Environment**, v.78, p.178-186, 1989.
51. SILVANY-NETO, A. M.; CARVALHO, F. M.; TAVARES, M. T.; GUIMARÃES, G. C.; AMORIM, C. J. B.; PERES, M. F. T.; LOPES, R. S.; ROCHA, C. M.; RAÑA, M. C. Lead poisoning among children of Santo Amaro, Bahia, Brazil in 1980, 1985, and 1992. **Bulletin of Pan American Health Organization**, v.30, p.51-62, 1996.
52. SPANÓ, M. A & GRAF, U. Segundo Taller sobre SMART: um método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica em células somáticas de *Drosophila* en la Universidad Federal de Uberlândia (MG), Brasil. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.14, p.111-114, 1998.
53. SPANÓ, M. A.; HANSJÖRG, F.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v.16, p.385-394, 2001.
54. STOHS, S. J.; BAGCHI, D.; HASSOUN, E.; BAGCHI, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.20, p.77-88, 2001.

55. STRØMGREN, T.; SØRSTRØRM, S. E.; SCHOU, L.; KAARSTAD, I.; AUNAAS, T.; BRAKSTAD, O. G.; JOHANSEN, Ø. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. **Marine Environmental Research**, v.40, p.147-169, 1995.
56. SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Introdução à Genética**, 4^a. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 856p.
57. USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Quality criteria for water. Washington, D.C, 1976.
58. USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, D.C, 1994.
59. USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. The incidence and severity of sediment contamination in surface waters of the United States. Washington, D. C., 1997.
60. VARGAS, V. M. F., MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v.319, p.31-45, 1993.
61. WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B.; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v.192, p.95-117, 2003.
62. WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236, 1998.
63. XIE, H.; WISE, S. S.; HOLMES, A. L.; XU, B.; WAKEMAN, T. P.; PELSUE, S. C.; SINGH, N. P.; WISE, J. P. Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. **Mutation Research**, v.586, p.160-172, 2005.
64. YESILADA, E. Genotoxicity testing of some metals in the Drosophila wing Somatic Mutation and Recombination Test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.66, p.464-469, 2001.