

 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO PARAGUAI NO TRECHO
DE CÁCERES (MT) PELO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES E TESTE
MANCHA DE ASAS DE DROSOPHILA**

Aluna: Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

UBERLÂNDIA - MG
2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO PARAGUAI NO TRECHO
DE CÁCERES (MT) PELO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES E TESTE
MANCHA DE ASAS DE DROSOPHILA**

Aluna: Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

**UBERLÂNDIA-MG
2008**

P644a Pimenta, Vânia Maria Sartini Dutra, 1957-
Avaliação das águas superficiais do Rio Paraguai no trecho de
Cáceres (MT) pelo teste de micronúcleos em peixes e teste mancha de
asas de *Drosophila* / Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta. - 2008.

151 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Mutagênese - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universida-
de Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575.224.4

PALAVRAS-CHAVE DO TRABALHO: SMART, Mutagênese, Ambiente Fluvial,
Mato Grosso.

**AVALIAÇÃO DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO PARAGUAI NO TRECHO
DE CÁCERES (MT) PELO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES E TESTE
MANCHA DE ASAS DE DROSOPHILA**

ALUNA: Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Dr. Júlio César Nepomuceno (Orientador)

Examinadores: Prof^a. Dr.^a Lusânia Maria Gregg Antunes – USP

Prof^a. Dr.^a Viviane Souza do Amaral – CEFET – PI

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó – UFU

Prof^a. Dr.^a Sandra Morelli – UFU

Data da Defesa: 30/01/2008.

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar”. “Todo pasa y todo queda, pero lo nuestro es pasar, pasar haciendo caminos, caminos sobre la mar.” (Antonio Machado)

***Aos meus filhos Leonardo e Camila.
À minha mãe Lázara e ao meu pai João,
que viajou desta vida durante esse trajeto.
Que saudade!***

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela oportunidade desta conquista e pelos melhores momentos de minha vida.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, que nunca mediu esforços em ensinar e ajudar em minhas limitações, que confiou, acreditou e aceitou este desafio comigo.

Aos Professores componentes da banca examinadora - Titulares: Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes – USP, Dra. Viviane Souza do Amaral – CEFET – PI, Dr. Mário Antônio Spanó – UFU e Dra. Sandra Morelli – UFU; - Suplentes: Dr. Luiz Carlos Guilherme e Dr. Édson José Fragiorge – EAFUDI, por ter aceitado a contribuir em este trabalho.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que colaboraram com minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelo apoio financeiro e institucional que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas (MG), pelo apoio no uso de seu Laboratório de Citogenética e Mutagenese.

A Coordenação do *Campus* Universitário Jane Vanini (UNEMAT/Cáceres), bem como ao Departamento do Curso de Ciências Biológicas, pelo apoio.

Aos funcionários da Universidade Federal de Uberlândia: Gerson Fraissat Mamede Filho (Secretário do COGEB) e Marcos Cavalcanti do ISTEAC da Biblioteca da UFU (*Campus* Umuarama), que tanto colaboraram comigo, com competência e amizade.

Aos companheiros que colaboraram em todas as minhas coletas: Professores: Claumir César Muniz, Paulo Luiz da Silva (em especial), Renata Miranda Cebalho e Josefa Silva dos Santos; funcionários da UNEMAT, em especial Marcelo Tomaz da Silva.

Ao funcionário da Fundação Estadual de Meio Ambiente Sr. Heloísio José Benacho (Manga Rosa), por ter pilotado o barco em todas as coletas realizadas, por ter pescado muitos peixes.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Pavanin do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelas orientações e análise química da água e sedimentos.

À Dra. Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dorez do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso, pelo empréstimo da draga empregada em todas as coletas de sedimentos do rio.

Ao Prof. Dr. Francisco Langeani, Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP - *Campus* de São José do Rio Preto, pela identificação da espécie *Leporinus friderici* (Bloch, 1794).

À Prof^a. Dra. Wanderlene Blanco Nunes e Prof. Dr. Salvador de Carvalho, ambos da Universidade Federal de Goiás, pelo apoio no uso do Laboratório de Mutagênese da UFG.

Ao Prof. Prof. Dr. Luiz Artur Bataus, da Universidade Federal de Goiás, pelo apoio.

Ao meu marido e nossos filhos pela paciência, amor e apoio incondicional.

À minha irmã Fabíola Aparecida Sartini. Dutra Parreira de Almeida e meus pais, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório e de muitas disciplinas: Alexandre Azenha Alves de Rezende, Dr. Bruno Lassmar Bueno Valadares, MSc. Denise Gonçalves Pereira; MSc. Elaine Silvia Dutra, Dr. Édson José Fragiorge, MSc. Neila Coelho de Sousa, Dra. Silmara de Moraes Pantaleão, Dra. Wanderlene Blanco Nunes, MSc. Zaira da Rosa Gutierre, MSc. Wender Ferreira Costa e muitos outros, pela amizade, companheirismo e pelas lembranças e saudades que ficarão. Até um dia....

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com minha formação.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) e no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (Patos de Minas-MG), com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).
- Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

LISTA DE ABREVIATURAS

NA – Anormalidades nucleares.

BH - Heterozigoto balanceado.

CMN – Células micronucleadas.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente.

Cr – Cromo.

Cr (III) – Cromo trivalente.

Cr (VI) – Cromo hexavalente.

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio.

DQO – Demanda química de oxigênio.

FEMA – Fundação Estadual Meio Ambiente.

***flr*³** - Gene marcador flare localizado no cromossomo 3.

HB - Cruzamento de alta bioativação.

MH - Trans-heterozigoto marcado.

MN – Micronúcleo.

MT – Estado de Mato Grosso (Brasil).

mwh - Gene Marcador *multiple wing hairs* localizado no cromossomo 3.

OD – Oxigênio dissolvido.

***ORR; flr*³** - *Oregon R, flare*³.

PAHs - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

pH – Potencial hidrogenionte.

PNMA - Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal)

SMART - Somatic Mutation And Recombination Test.

S – Sulfetos.

SO_x – Óxidos de enxofre.

ST - Cruzamento standart (padrão).

TMNP- Teste do Micronúcleo em Peixes.

***TM3, Bd*^s** – Cromossomo balanceador com múltiplas inversões.

Ure – Uretano.

+ - Gene selvagem.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

- Figura 1** – Fotomicrografia em células vermelhas de sangue de peixes, coradas com giemsa, aumento de 1.000 X. As setas mostram os micronúcleos. 05
- Figura 2** - Esquema de tratamento crônico (48h de exposição ao agente) utilizado no SMART (Graf et al., 1984 com modificações). 09
- Figura 3.1** - Esquema genético mostrando os eventos genotóxicos que levam a formação de manchas simples em asas de *Drosophila melanogaster* (Graf et al., 1984 com modificações). 10
- Figura 3.2** - Esquema genético mostrando os eventos genotóxicos que levam a formação de manchas simples e gêmeas em asas de *Drosophila melanogaster* (Graf et al., 1984 com modificações). 11
- Figura 4** – Alturas do nível das águas do Rio Paraguai: máxima, mínima em cada mês e no dia da coleta – Dados: Agência Fluvial de Cáceres/ Marinha. 17
- Figura 5** – Localização dos sítios de coletas. 18
- Figura 6** - Sítio 1 em período de cheia (15/03/2005). 19
- Figura 7** - Baía do Malheiros (www.caceres.mt.gov.br) 20
- Figura 8** - Sítio 3 - Córrego Sangradouro em período de cheia (15/03/2005). 20
- Figura 9** - Sítio 3 - Córrego Sangradouro em período de seca (29/08/2004). 21
- Figura 10** - Sítio 2 - Efluente do Frigorífico em período de seca (29/08/2004). 21
- Figura 11** - Sítio 1 – Manilha que leva os efluentes do curtume de couro, para o fundo do rio, em período de seca (29/08/2004). 22
- Figura 12** - Sítio 1 – Manilha que leva os efluentes do curtume de couro para fundo do rio quebrada (29/08/2004). 23

Capítulo 2:

- Figura1** - Localização do Rio Paraguai em Cáceres – MT, Brasil, mostrando os sítios de coletas utilizados neste estudo. 53
- Figura 2** – Frequências totais de manchas mutantes por mosca, observados em descendentes “MH” de *D. melanogaster*, proveniente do

Cruzamento ST, tratados com águas de todas as coletas de todos os sítios estudados. 60

Figura 3 – Frequências totais de manchas mutantes por mosca, observados em descendentes “MH” de *D. melanogaster*, proveniente do Cruzamento HB, tratados com águas de todas as coletas de todos os sítios estudados. 66

Capítulo 3:

Figura - 1. Localização de Cáceres e dos sítios de estudo. 88

Anexos:

- 1: Figure 1 - The localization of Cáceres and the study site. 116
- 2: Figure 1 - The localization of Cáceres and the study site. 149

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2:

Tabela I - Análises físico-químicas conduzidas durante as coletas feitas no Rio Paraguai.	54
Tabela II Resultados das análises químicas das amostras de água feitas no Rio Paraguai em agosto de 2004 e março de 2005.	55
Tabela III – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 1), em Cáceres – MT.	56
Tabela IV – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 2), em Cáceres – MT.	57
Tabela V – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 3), em Cáceres – MT.	58
Tabela VI – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 4), em Cáceres – MT.	59
Tabela VII – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 1), em Cáceres – MT.	61
Tabela VIII – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 2), em Cáceres – MT.	62
Tabela IX – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em <i>Drosophila melanogaster</i> (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do	

Cruzamento Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 3), em Cáceres – MT. 63

Tabela X – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 4), em Cáceres – MT. 64

Tabela XI – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 4), em Cáceres – MT. 65

Capítulo 3

Tabela I - Análises físico-químicas conduzidas durante as coletas feitas no Rio Paraguai. 89

Tabela II - Resultados das análises químicas das amostras de água e sedimento feitas no Rio Paraguai em abril e agosto de 2004. 90

Tabela III - Frequências de células micronucleadas (CMN) e micronúcleos (MN) em eritrócitos periféricos de *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici* coletados no Rio Paraguai, no trecho da cidade de Cáceres – MT, em abril e agosto de 2004. 91

Anexos:

1:

Table I. Physicochemical analyses conducted during Paraguay River water collection. 117

Table II. Summary of results from chemical analysis of Paraguay River water samples collected in August 2004 and March 2005. 118

Table III Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) after chronic treatment of larvae from ST and HB crosses with superficial waters from the Paraguay River. 119

2:

Table I - Physicochemical analyses conducted during Paraguay River water collection. 150

Table II - Chemical analyses of water and sediments from the four studied sites. 151

Table III. - Frequency of micronucleate cells (MNC) and micronuclei (MN) in peripheral erythrocytes of *Pimelodus maculatus* and *Leporinus friderici* collected in the Paraguay River at Cáceres, MR, in the rainy (April) and dry (August) seasons of 2004. 152

SUMÁRIO

Apresentação

Objetivos

Capítulo 1 – Fundamentação teórica

1.1- Preâmbulo.	01
1.2 – Sistemas-teste para avaliação de genotoxicidade de ambientes aquáticos.	02
1.2.1 - Teste do Micronúcleo (TMN).	03
1.2.2 - Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART).	06
1.3 - Objeto de estudo.	12
1.3.1 - Pantanal X Rio Paraguai.	12
1.3.2 – Cáceres.	15
1.3.3 – Metodologia de Estudo: Coletas e caracterização dos sítios de estudo.	16
1.3.3.1 - Sítios: características específicas.	19
1.4 – Referências.	23

Capítulo 2 – Manuscrito: Genotoxicidade da água do Rio Paraguai, Cáceres – MT, Brasil, pelo teste da mancha em asas de <i>Drosophila melanogaster</i>.	35
---	-----------

Capítulo 3 – Manuscrito: Avaliação <i>in situ</i> da água do Rio Paraguai, Cáceres – MT, Brasil, pelo Teste de Micronúcleos em Peixes e análises químicas.	67
---	-----------

Anexos.	92
----------------	-----------

Considerações finais.	153
------------------------------	------------

APRESENTAÇÃO

Cáceres é uma cidade turística do Estado de Mato Grosso, Brasil, localizada a 210 Km da capital Cuiabá, GPS = 16°11'42" L. S. e 57°40'51' L. O., margem esquerda do Rio Paraguai, a 118 m acima do nível do mar e conhecida como portal do Pantanal.

O Rio Paraguai é o principal tributário da Bacia do Alto Paraguai, nasce no município de Diamantino, Estado de Mato Grosso, no Planalto dos Parecis, segue em direção sudoeste, coletando contribuições difusas de outros rios, cujas águas fluem ao Pantanal mato-grossense.

Cáceres recebe várias ações antropogênicas em seu ambiente aquático, que podem alterá-lo de forma espacial e temporal. O crescimento urbano é desordenado e os efluentes de esgotos sanitários e agro-industriais (resíduos de frigorífico, curtume de couro e de laticínios) são jogados diretamente ou indiretamente no Rio Paraguai, pois os esgotos sanitários não são tratados. Os impactos proporcionados pela hidrovía Paraguai-Paraná têm sido alvo de questionamentos quanto às alterações do meio aquático. Anualmente é realizado em Cáceres o Festival Internacional de Pesca, maior campeonato de água doce do mundo, cujos impactos contribuem para degradação das águas do Rio Paraguai, devido à presença de grande número de barcos motorizados.

Considerando que são pobres os dados sobre a avaliação da qualidade das águas do Rio Paraguai, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos das águas superficiais do Rio Paraguai no trecho de Cáceres-MT. Para tanto, foram empregados o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em asas de *Drosophila melanogaster* (SMART) e Teste de Micronúcleos em Peixe (TMNP), bem como análises físico-químicas *in loco* e análises químicas de águas e sedimentos. Foram selecionados quatro sítios, sendo um considerado não poluído (1) e três considerados os mais poluídos, para realização do estudo. As coletas foram feitas nos períodos de setembro/2003, abril/2004, agosto/2004 e março/2005, portanto, duas coletas em períodos de seca e duas de cheia em quatro sítios selecionados.

No primeiro capítulo está contida a fundamentação teórica que subsidiou o presente estudo, enquanto que nos anexos estão dois manuscritos, na forma de publicação em periódicos científicos.

Foram analisadas 4.830 asas de *Drosophila melanogaster*, sendo 2.218 de descendentes do cruzamento ST e 2.612 do HB do Teste SMART para o manuscrito “Genotoxicidade da água do Rio Paraguai, Cáceres – MT, Brasil, pelo teste da mancha em asas de *Drosophila*”, estão demonstrados no Capítulo 2. Para o manuscrito “Avaliação *in situ* da água do Rio Paraguai, Cáceres – MT, Brasil, pelo Teste de Micronúcleos em Peixes e análises químicas”, foram analisados 288.000 células vermelhas do sangue de 56 espécimes de *Pimelodus maculatus* e 15 de *Leporinus friderici*, conforme demonstração no Capítulo 3.

As análises físico-químicas *in loco* realizadas em todas as coletas foram quanto aos aspectos: altura do nível das águas, temperatura, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, e turbidez. Foram realizadas análises químicas de sedimento nas coletas de abril e agosto de 2004, e de água as de agosto de 2004 e março de 2005, em todas as coletas. Os resultados de ambas as análises são discutidos nos Capítulos 2 e 3.

OBJETIVOS:

Geral

Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos das águas superficiais de quatro sítios do Rio Paraguai, no trecho de Cáceres-MT, por meio do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em asas de *Drosophila melanogaster* (SMART) e do Teste de Micronúcleos em Peixe (TMNP).

Específicos:

- Avaliar e comparar, durante dois anos, os possíveis efeitos genotóxicos das águas superficiais dos sítios considerados poluídos, por meio do SMART;
- Avaliar e comparar, durante um ano, os possíveis efeitos genotóxicos dos sítios considerados poluídos em *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici*, por meio do TMNP;
- Comparar os possíveis efeitos genotóxicos das águas superficiais entre os períodos de cheia e de seca;
- Comparar as características físico-químicas das amostras de água superficial de cada sítio, entre os períodos de cheia e de seca.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 - Preâmbulo

Graças à enorme urbanização e desenvolvimento industrial ao longo de margens e beira-mar, têm sido introduzidas em grandes massas de água, quantidades diversas de substâncias ativas biologicamente, inclusive milhares de compostos químicos artificiais inorgânicos e orgânicos (xenobióticos) (Bresler et al., 1999), oriundos dos resíduos industriais, resíduos sanitários, agrícolas e outros entram freqüentemente nestes rios por descarga aquosa direta (White e Rasmussen, 1998; Vargas et al., 2001; White e Claxton, 2004).

A poluição aquática é um sério e crescente problema (Çavas e Ergene-Gözükar, 2005b) e é a principal preocupação ambiental em áreas urbanas (Prá et al., 2005). O controle dessa poluição é um dos grandes desafios da população humana na atualidade, visto que as previsões de escassez desse recurso natural vêm gerando preocupação em vários setores da sociedade (Oliveira-Filho et al., 2006).

Os impactos ambientais provenientes dos metais pesados são mais preocupantes do que as excessivas cargas orgânicas degradáveis (Oliveira e Pasqual, 2004). Metais tóxicos e suas combinações tendem a se acumular nos organismos (Ferraro et al., 2004) e muitos são potentes mutágenos capazes de induzir tumores em humanos e animais experimentais (Matsumoto et al., 2006).

Além dos metais pesados, contaminantes como hidrocarbonetos de petróleo e praguicidas podem causar efeitos tóxicos diretos, quando liberados em ambientes aquáticos (Fleeger et al., 2003). Águas residuais urbanas (sanitárias) podem conter agentes genotóxicos (Zani et al., 2005), com ação direta no material genético (Ohe et al., 2003), pois, contêm uma ampla escala de substâncias como compostos nitrosos, aminas aromáticas e hidrocarboneto poli-aromáticos (PAHs) (Frölich e Würigler, 1990; White e Rasmussen, 1998).

Testes de genotoxicidade em amostras de efluentes industriais e de sítios ambientais contaminados demonstram que estas misturas ambientais complexas contêm muitos agentes tóxicos não identificados e não regulados, que são potentes carcinógenos (Claxton et al., 1998; Ohe et al., 2004).

As avaliações das águas de vários rios, inclusive *in loco*, por vários sistemas teste, demonstraram que elas sofrem múltiplas ações de fontes poluidoras de origem industrial, sanitárias e agrícolas (Sanchez-Galan et al.,

2001; Moraes e Jordão, 2001; Russo et al., 2004; Amaral et al., 2005; Amaral et al., 2006; Pantaleão et al., 2006; Pantaleão et al., 2007).

Portanto, hoje estamos atentos pelo fato dos mutágenos químicos estarem presentes em todo ambiente, incluindo água potável, água de superfície, sedimento aquático, solos, ar em recinto fechado, e ar de ambiente urbano. Porém, nossa compreensão (conhecimento), das fontes, destinos e perigos dos mutágenos em um ambiente complexo, é bastante limitada. O grande desafio hoje é o de investigar o perigo dos mutágenos, em amostras ambientais complexas (White, 2004). Então, a exposição, destino e efeitos de contaminantes químicos ou poluentes em ecossistemas aquáticos, devem ser estudados extensivamente por toxicólogos ambientais (van der Oost et al., 2003).

1.2 – Sistemas-teste para avaliação de genotoxicidade de ambientes aquáticos.

Muitas espécies animais podem ser usadas como bioindicadores de genotoxicidade (Cristaldi et al., 2004). Um dos problemas principais no biomonitoramento de poluentes genotóxicos é a escolha do organismo teste. Sensibilidade desigual entre espécies, causadas por diferentes taxas metabólicas, condições fisiológicas e órgãos designados na avaliação, pode produzir resultados enganosos. Por isto, mais que uma espécie deve ser usada para confirmar a resposta para genotóxicos sob condições experimentais (Campana et al., 2003).

O interesse crescente em genotoxicidade causados por poluentes ambientais conduziu ao desenvolvimento de vários testes biológicos para detectar e identificar genotóxicos no ar, água e terra (Grisolia e Cordeiro, 2000). Embora haja um número grande de ensaios para avaliar a genotoxicidade, apenas um número relativamente pequeno é empregado na avaliação de misturas complexas (Claxton et al., 1998). Alguns métodos são empregados de forma isolada ou combinados, para verificar a habilidade de medir genotoxicidade, particularmente em águas de superfície naturais (Reifferscheid e Grummt, 2000), tais como: SMART (Karekar et al., 2000; Amaral et al., 2005; 2006; Pantaleão et al., 2007); Micronúcleos (Ma et al., 1995; Wang, 1999; Moraes e Jordão, 2001;

Çavas e Ergene-Gözükara, 2003; 2005a; 2005b; Andrade et al., 2004; Buschini et al., 2004; Pantaleão et al., 2006); Cometa (Andrade et al., 2004); Ames (Karekar et al., 2000; Ohe et al., 2003).

1.2.1 - Teste do Micronúcleo (TMN)

O micronúcleo origina-se da cromatina que, por razões diferentes, é retardada na anáfase. No curso da telófase este material é incluído em uma ou a outra célula filha, podendo permanecer fundido ao núcleo principal, ou ainda, formar um ou vários núcleos secundários. Como uma regra, micronúcleos são consideravelmente menores que o núcleo principal, por isto, é chamado de micronúcleo. O retardamento tem duas causas principais, a quebra de cromossomo e o mau funcionamento das fibras do fuso. No primeiro caso, os elementos retardatários são fragmentos cromossômicos acêntricos e, no segundo caso, eles consistem em cromossomos inteiros (Schmid, 1975; Heddle et al., 1991; Ma et al., 1995; Grover e Kaur, 1999). Portanto, os micronúcleos são formados no final da divisão celular, ao lado do núcleo principal (Al-Sabti et al., 1994; Mersch e Beauvais, 1997; Chung et al., 2002).

O TMN, empregado originalmente em mamíferos de pequeno porte, é um método para avaliar a genotoxicidade por meio de eritrócitos da medula óssea (Schimid, 1975). A partir de então, várias adaptações metodológicas foram feitas no sentido de se utilizar o método em diversos organismos teste. Podemos destacar alguns organismos teste na avaliação da presença do micronúcleo: moluscos (Bresler et al., 1999); girinos (*H. pulchella*) (Lajmanovich et al., 2005); mamíferos ungulados domésticos (Cristaldi et al., 2004); linfócitos humanos (Maffei et al., 2000; Fenech et al., 2003, Levario-Carrillo et al., 2005; Ergene et al., 2007); cordão umbilical humano (Levario-Carrillo et al., 2005); células epiteliais bucais humanas (Ergene et al., 2007); células de brânquias de peixes (Çavas e Ergene-Gözükara 2005a); eritrócitos periféricos de salamandra aquática (Jaylet et al., 1986); meristemas de raiz de *Vicia faba* (Wang, 1999); células de *Allium cepa* e *Vicia faba* (Ma et al., 1995); células vermelhas do sangue de peixes (Nepomuceno et al., 1997; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005a; 2005b; Andrade et al., 2004; Pantaleão et al., 2006).

Atualmente, o TMN é empregado, também, como método de biomonitoramento de ambientes poluídos, com intuito de se detectar a presença de agentes genotóxicos (Minissi et al., 1996; Sanchez-Galan et al., 2001; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005b; Pantaleão et al., 2006).

Os peixes são freqüentemente utilizados quando a avaliação da contaminação é feita em ambientes aquáticos (Minissi et al., 1996; Nepomuceno et al., 1997; Hayashi et al., 1998; Bresler et al., 1999; Grisolia e Cordeiro 2000; Palhares e Grisolia 2002; Farah et al., 2003; Andrade et al., 2004; Krumschnabel e Nawaz 2004; Pantaleão et al., 2006). O peixe é um modelo experimental adequado, para monitoramento aquático de genotoxinas, devido a sua habilidade em metabolizar xenobiótico e acumular contaminantes (Grisolia e Cordeiro, 2000; Matsumoto et al., 2006).

O emprego do TMN apresenta várias vantagens, conforme a seguir:

- pode ser empregado tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que *in vivo* a atividade metabólica do animal é mantida, não ocorrendo o mesmo em um sistema teste *in vitro* (Formigli et al., 2002);
- apresenta sensibilidade para medir atividade genotóxica em condições laboratoriais e no campo (Grisolia e Starling, 2001);
- pode ser aplicado em qualquer população de células em proliferação, sem levar em conta o seu cariótipo, pois o teste não é afetado pelo pequeno tamanho e o grande número de cromossomos, assim, pode ser facilmente aplicado para peixe ou outro organismo aquático (Hayashi et al., 1998);
- amostras de sangue periférico são apropriadas e suficientes para avaliações em projetos de biomonitoramentos, pois permite colecionar várias amostras do mesmo indivíduo, sem que haja a necessidade de sacrificar o animal (Nepomuceno et al., 1997; Palhares e Grisolia, 2002).

Microscopicamente, micronúcleos são pequenos corpúsculos, não refratários, circulares ou ovóides, exibindo a mesma coloração padronizada do núcleo principal, conforme mostra a Figura 1.

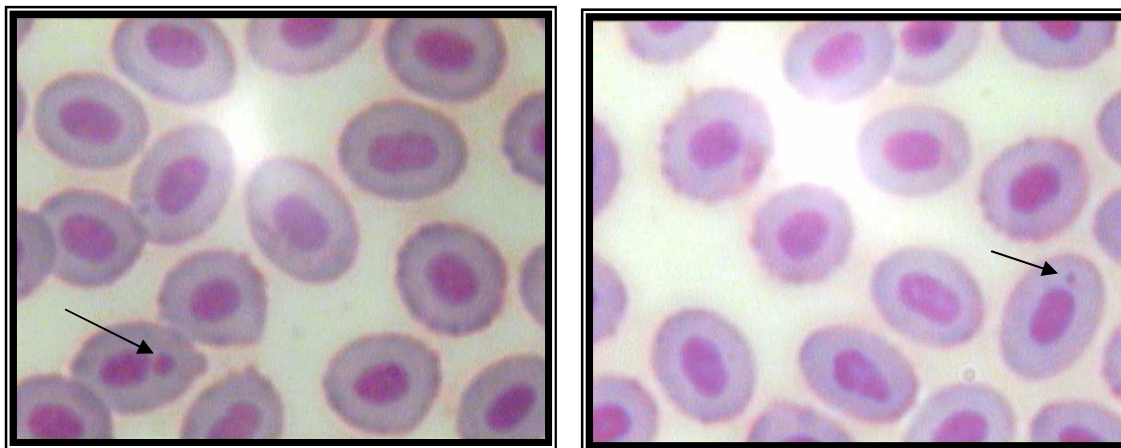


Figura 1 – Fotomicrografia em células vermelhas de sangue de peixes, coradas com Giemsa, aumento de 1.000 X. As setas mostram os micronúcleos.

As anormalidades nucleares (AN) foram descritas, fotografadas e classificadas por Carrasco et al. (1990). De acordo com Çavas e Ergene-Gözükkara (2005a; 2005b) estas anormalidades podem ser classificadas como: células com dois núcleos são consideradas como binucleadas; núcleos “Blebbbed” são os que têm uma pequena invaginação da membrana nuclear contendo cromatina; núcleos “Lobed” têm maiores invaginações da membrana nuclear que o Blebbbed e podem ter vários lóbulos; núcleos “Notched” são os que têm um entalhe, ou uma fenda bem definida, de largura uniforme, que estende a uma profundidade apreciável para dentro do núcleo. As frequências de AN podem ser usadas como complemento do teste.

A origem dos micronúcleos é bem conhecida (Heddle et al., 1991; Çavas e Ergene-Gözükkara, 2003), mas os mecanismos básicos na formação de anormalidades nucleares ainda não foram explicados completamente (Çavas e Ergene-Gözükkara, 2003). Apesar de que uma correlação entre anormalidades nucleares e efeitos genotóxicos ainda não tenham sido estabelecidas, estudos sugerem que tais alterações morfológicas são manifestações dos efeitos de agentes xenobióticos (Ferraro et al., 2004).

1.2.2 - Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O SMART, também conhecido como teste da mancha das asas de *Drosophila melanogaster*, descrito por Graf et al., (1984). Este organismo eucarioto tem se mostrado ideal para estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade *in vivo*, por possuir pequeno número de cromossomos, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, tempo curto de geração, grande número de mutantes, linhagens bem caracterizadas, além do baixo custo, rapidez e confiabilidade (Graf et al., 1984; Vogel, 1987).

O SMART de asas é sensível e eficiente para monitoramento de poluição ambiental, devido à possibilidade na detecção de genotoxicidade de contaminantes que estão presentes em extratos na fase gasosa e de partículas materiais de vários tipos de amostras de ar (Delgado-Rodriguez et al., 1995; 1999; Dihl et al., 2008). O teste mostra-se sensível, também, na detecção de agentes genotóxicos presentes no ambiente aquático fluvial (Amaral et al., 2005; Amaral et al., 2006; Pantaleão et al., 2007). Portanto, um importante teste no monitoramento de áreas sob descargas antropogênicas (Amaral et al., 2005). O SMART não é só útil para analisar a atividade genotóxica de compostos puros simples, como também investigar genotoxicidade de misturas complexas de várias origens (Sarıkaya e Çakyr, 2005), inclusive de promutágenos e procarcinógenos (Graf e Singer, 1992). É altamente eficiente para detectar atividade genotóxica de mutágenos de várias classes químicas (Spanó et al., 2001). A versatilidade do teste proporciona avaliar compostos estáveis e instáveis, como também componentes químicos dissolvidos e substâncias químicas gasosas. Portanto, o SMART detecta ação direta de mutágenos; promutágenos; mutágenos instáveis em solução aquosa; de mutágenos com diferentes modos de ação (Graf et al., 1984).

Para emprego deste teste, são utilizadas linhagens de *D. melanogaster* que carregam marcadores genéticos (*fl³* e *mwh*): (1) Linhagem *flare³* (*flr³*) com constituição genética *flr³/In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; (2) Linhagem *ORR*, com constituição genética *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p⁰ sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* e (3) Linhagem *Multiple wing hairs* (*mwh*), com constituição genética *y; mwh j*, que carrega o gene *mwh*.

As moscas da linhagem *mwh* possuem o gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pêlos em cada célula. A linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Os indivíduos *flare*³ possuem o gene *flr*³ numa posição proximal, também no cromossomo 3 (3-38,8) e o pêlo malformado é caracterizado por se assemelhar a uma chama. O gene marcador *flr*³ é letal em homozigose (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995), no entanto, foi desenvolvido um cromossomo homólogo balanceador *TM3, Bds* (*Third Multiple 3, Beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem *flr*³ (Lindsley e Zimm, 1992).

A linhagem *Oregon R; flare*³ (*ORR*) foi construída por Frölich e Würgler (1989) e apesar de apresentar o marcador *flr*³, se difere da linhagem *flare*³ por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon R* resistente ao DDT, além de possuir alta atividade de enzimas citocromo P.450 (Halltröm e Blank, 1985). Pelo alto nível de citocromo P.450 constitutivo na linhagem *ORR*, o teste SMART torna-se mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo.

Para o desenvolvimento do teste são realizados dois tipos de cruzamentos:

1) Cruzamento padrão (ST - Standard Cross): fêmeas virgens *flr*³/*ln*(3LR)*TM3*, *ri p^p sep l*(3)89Aabx^{34e} e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (Graf et al., 1989);

2) Cruzamento de alta bioativação (HB - High Bioactivation Cross): fêmeas virgens *ORR; flr*³/*ln*(3LR)*TM3*, *ri p^p sep l*(3)89Aabx^{34e} e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (Graf e van Schaik, 1992).

Destes cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseados no marcador *TM3, Bd^s*. Os MH (*mwh +/+ flr*³) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os BH (*mwh +/+ TM3, Bd^s*) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3, Bd^s*) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Os indivíduos MH expressam pêlos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr*³. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador *TM3/Bd^s* que devido suas múltiplas inversões, não encontramos eventos recombinogênicos,

apenas eventos mutagênicos, pois, neste caso, os produtos dos eventos recombinogênicos são inviáveis. O fenótipo do descendente heterozigoto marcado (MH) desenvolve asa normal, com borda lisa, enquanto que no heterozigoto balanceado (BH), as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas “serrate” (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

A Figura 2 representa um esquema de tratamento crônico (48h de exposição ao agente) utilizado no SMART.

O teste da mancha da asa (SMART) baseia-se em grupos de células, discos imaginais, que proliferam separadamente durante o desenvolvimento até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas etc.) (Graf e van Schaik, 1992). Então, pêlos mutantes são, a partir daí, classificados em manchas: simples quando expressam apenas um dos marcadores *mwh* ou *flr*³ originadas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou recombinação distal (Figuras 3.1 e 3.2); e gêmeas quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr*³ na mesma mancha (Graf et al., 1984) (Figura 3.2).

Ovos dos cruzamentos ST e HB são coletados por um período de 8 horas em frascos de cultura (vidro de 250 mL) contendo uma base sólida de 3% ágar cobertas com uma camada do fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) enriquecido com açúcar. Para os tratamentos, larvas com 72 ± 4 horas de vida são removidas dos frascos, lavadas em água, com auxílio de coador de malha fina de aço, e transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batatas, acrescido com 5 mL do componente teste. Todo o experimento é realizado a temperatura de $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e 65% de umidade.

Após o período de metamorfose, as moscas adultas são acondicionadas em etanol 70 %. Inicialmente todas as moscas independente de sexo são classificadas de acordo com a presença/ausência do fenótipo de *Bd*^S. A seguir, cada tipo de descendente é classificado quanto ao sexo. Usando um microscópio estereoscópico standard e pinças entomológicas, as asas são removidas e montadas em lâminas em solução de Faure (30 g goma arábica; 20 ml de glicerol; 50 g hidrato cloral; 50 ml de água). Superfícies dorsais e ventrais são analisadas em microscópio óptico de luz, com 400 X ampliação. Durante as análises das lâminas, as manchas são anotadas de acordo com o tipo e tamanho, de acordo com as seções da asa (Graf et al., 1984).

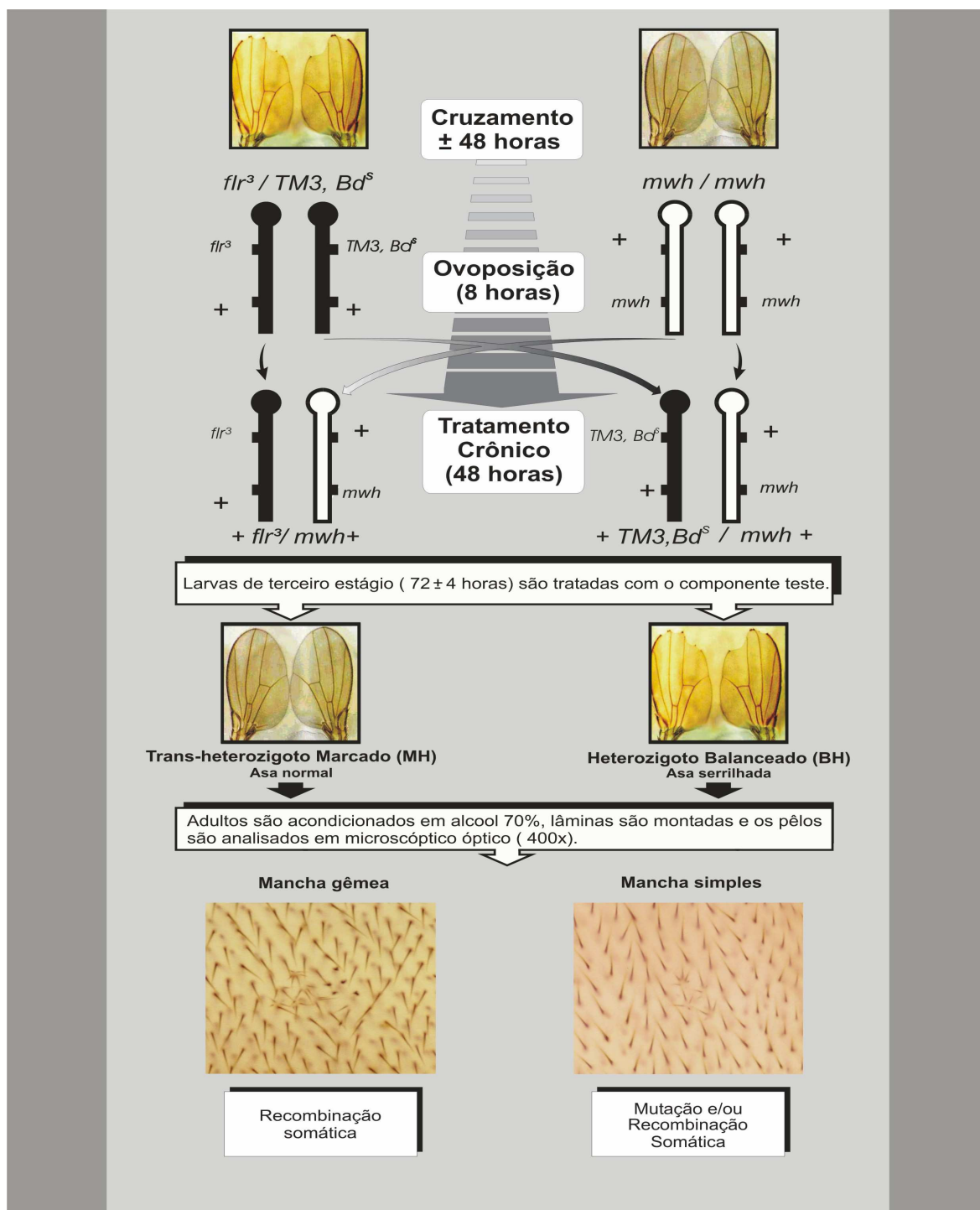


Figura 2 - Esquema de tratamento crônico (48h de exposição ao agente) utilizado no SMART (Graf et al., 1984 com modificações).

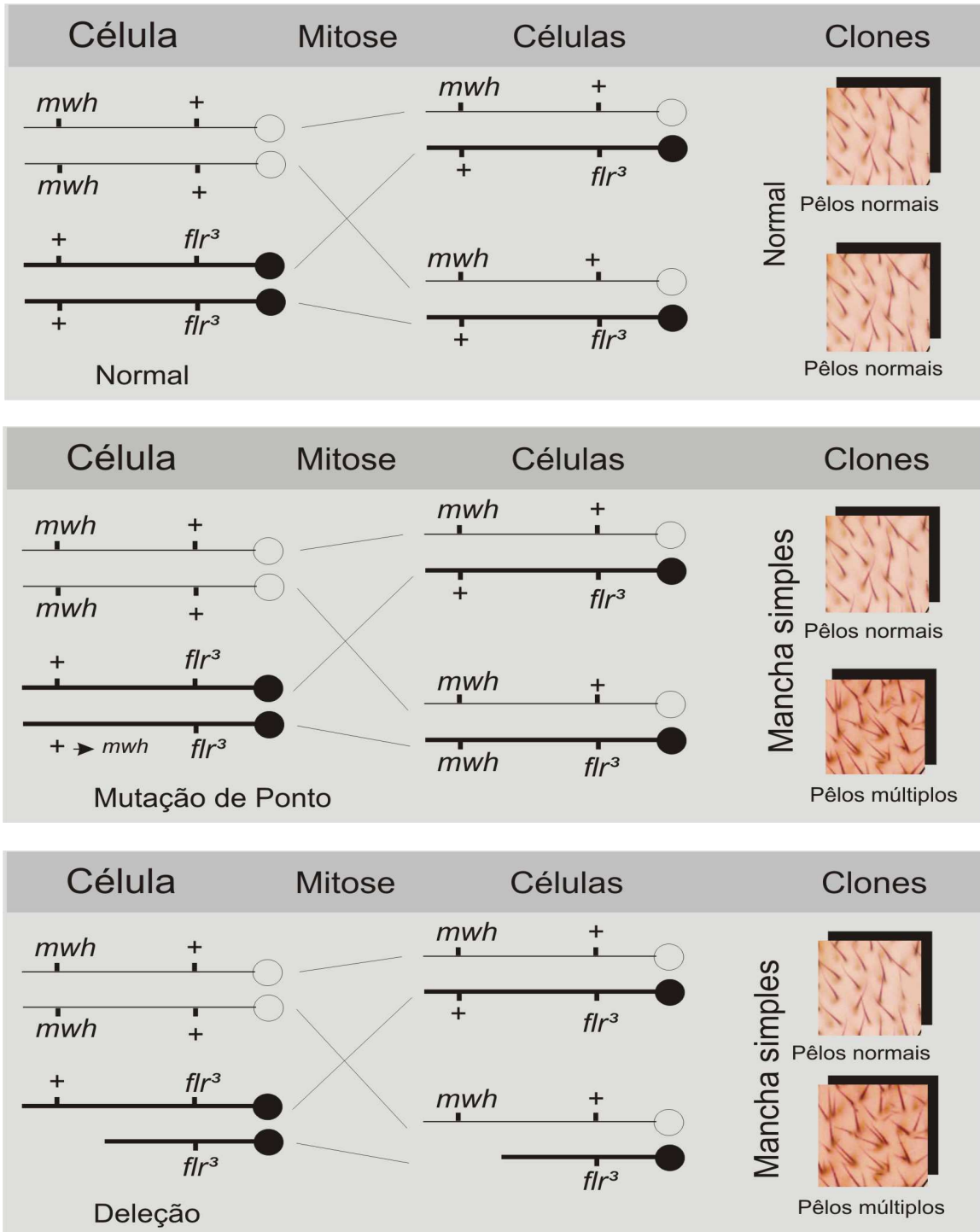


Figura 3.1 - Esquema genético mostrando os eventos genotóxicos que levam a formação de manchas simples em asas de *Drosophila melanogaster* (Graf et al., 1984 com modificações).

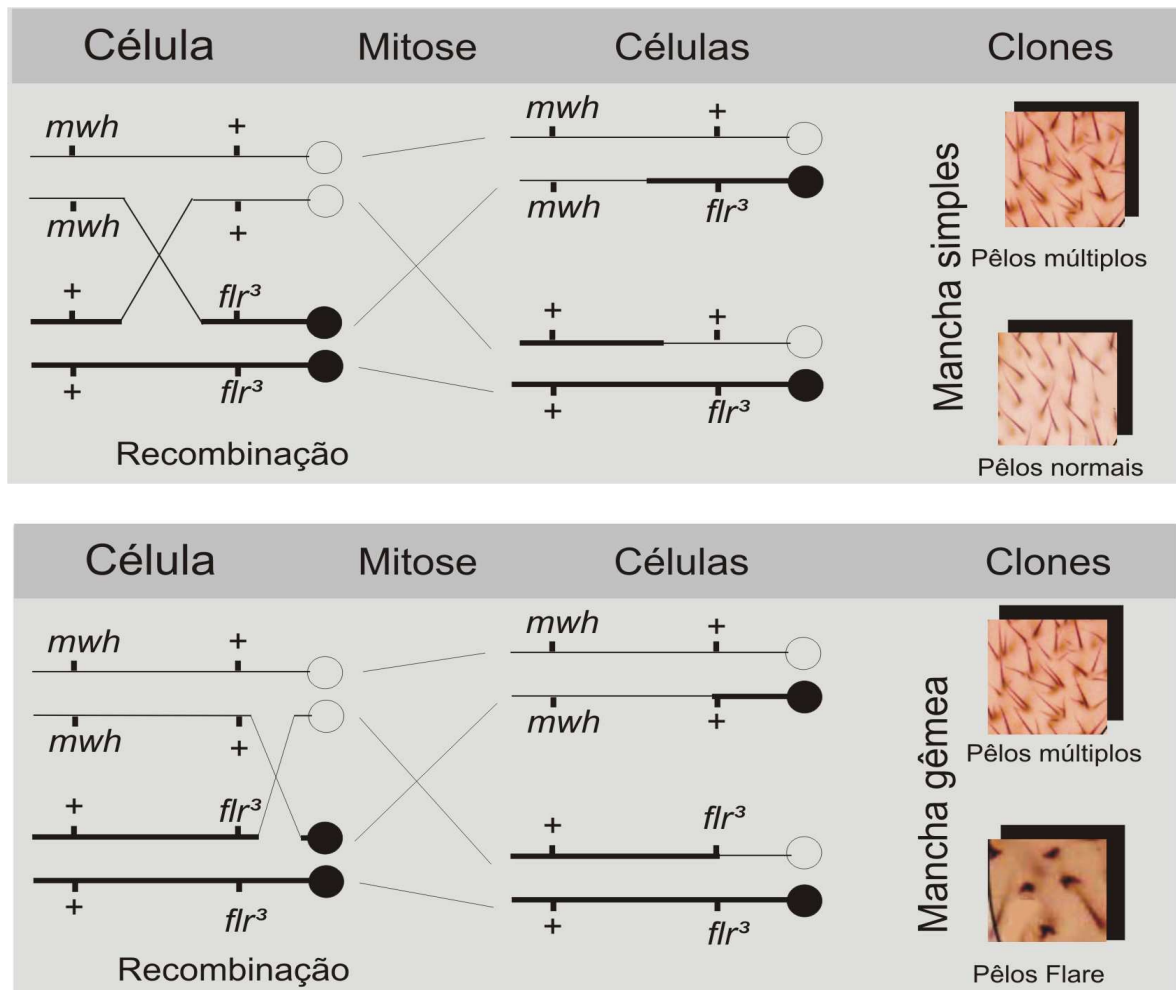


Figura 3.2 - Esquema genético mostrando os eventos genotóxicos que levam a formação de manchas simples e gêmeas em asas de *Drosophila melanogaster* (Graf et al., 1984 com modificações).

1.3 - Objeto de estudo

1.3.1 - Pantanal X Rio Paraguai

O Pantanal é uma das maiores áreas alagadas do mundo (Kuno, 2003), maior planície aluvial mundial, com uma área de aproximadamente 138.183 Km², composta de um mosaico de ambientes diferentes, sustentando suntuosas biotas aquáticas e terrestres (Silva, 2000). No Brasil, o Pantanal Mato-grossense se localiza no Oeste do Estado de Mato Grosso do Sul e Sudoeste de Mato Grosso (Silva et al., 2000; Kuno 2003). O Pantanal Mato-grossense fica situado na Bacia do Alto Paraguai, na parte central da América do Sul, entre longitudes 16° a 22° e latitudes 55° a 58°, e inclui partes do Brasil, Paraguai e Bolívia (Silva, 2000), ao longo do curso do Rio Paraguai Superior, um importante tributário do Paraná, um dos maiores rios da terra (Girard et al., 2003).

A região de Pantanal é um ecossistema especialmente frágil devido, principalmente, a formação geológica recente (terciária e quaternária) (Moraes e Jordão, 2001), constituída por terrenos sedimentares. Mas é um ecossistema de grande importância por apresentar uma biodiversidade ímpar, o que leva à preocupação quanto à sua preservação (Kuno, 2003). A sedimentação e inundação no Pantanal não são apenas condicionadas por mudanças climáticas e dinâmicas sedimentares, mas são, também, formadas por atividades tectônicas associadas com transmissão da extensão deposicional plana. Desmatamentos e atividades agrícolas nos planaltos circunvizinhos, que escoam para uma planície, aumentam a erosão e a sedimentação aluvial (Assine e Soares, 2004).

A planície do Pantanal é drenada pela Bacia do Alto Paraguai (Rio Paraguai, seus afluentes e subafluentes). A inundação sazonal determina a estrutura e a função dos ecossistemas de planície de inundação tropical. Então, informação sobre a variabilidade de espaço e tempo de inundação é fundamental para entender e administrar este ecossistema. A maioria das chuvas cai de novembro a março, na maioria das regiões pantaneiras, mas o cume do período chuvoso no Alto Paraguai é de março a abril (Hamilton et al., 1996). Portanto, o Pantanal Mato-grossense é um sistema ecológico especial, determinado pela alternância dos ciclos anuais de enchente e de vazante, que define as

comunidades bióticas que se estabelecem sazonalmente. Essa condição é de fundamental importância para a ictiofauna: o tempo de residência da água e os habitats formados condicionam a estrutura e composição das comunidades de peixes da região. A maioria das espécies de peixes possui ampla plasticidade sazonal de recursos na planície de inundação (Catella, 1992).

O equilíbrio frágil dos ecossistemas do Pantanal, mantido pelo pulso de inundação, é ameaçado pela nova direção de crescimento econômico, principalmente a modificação da geometria hidráulica do rio pelo desmatamento e alterações naturais. Estas tendências são mais evidentes no distrito da Bacia do Rio Paraguai superior, de onde as águas fluem ao Pantanal. Estudos ecológicos sobre o Pantanal ainda são incipientes, mas já permitem um entendimento geral do sistema (Silva, 2000). Os impactos ambientais de diferentes graus de intervenção de degradação, com efeitos causados por atividades econômicas, foram obtidos através das informações relativas a: desmatamentos, efeitos erosivos lineares e laminares, mananciais comprometidos pela poluição urbana, industrial, agropecuária, garimpos e mineração e ainda, áreas sujeitas às inundações periódicas (PNMA, 1997).

O Rio Paraguai nasce no estado do Mato Grosso, na região do Planalto dos Parecis, que é o grande divisor de águas entre a bacia Amazônica e a Platina (FEMA, 2003), nas encostas da Serra dos Parecis, na região norte. Segue direção geral sul, com certa sinuosidade até Corumbá. A partir daí, segue rumo sudeste, depois do rio Negro, segue ao sul até o Rio Apa, onde entra no território Paraguaio, e continua em direção ao sul até o Rio Paraná (Carvalho, 1986). A bacia hidrográfica do Alto Paraguai refere-se à área de drenagem do compartimento superior do rio Paraguai, que vai desde sua nascente até a foz do rio Apa, atravessa a fronteira, desenvolve-se no Paraguai e alcança a Argentina, onde deságua no rio da Prata (FEMA, 2003).

O Rio Paraguai flui ao longo do lado ocidental do Pantanal, enquanto colecionando água de vários tributários principais como também de contribuições de planícies aluviais difusas (Hamilton et al., 1997). O Rio Paraguai recebe águas de inúmeros afluentes que o alcançam com pouca velocidade e uma grande quantidade de sedimentos que vão se depositar na planície do Pantanal. As inundações se encarregam de espalhar parte do sedimento para fora das calhas

fluviais. A drenagem do Pantanal é feita por córregos, corixos, vazantes e baías. Córregos são pequenos cursos d' água; corixos são braços de rios que podem ficar secos por vários anos; vazantes são linhas de drenagem de uma área raramente inundada que se escoam para um pantanal ou para um rio, e baía é uma pequena lagoa ou antigo meandro (Carvalho, 1986).

As características físicas e químicas da superfície da água apresentam variações entre os períodos de cheia e estiagem. As diferenças entre os dois períodos são significativas em relação à condutividade elétrica e à concentração de nutrientes nos corpos de água estudados (Abdo e Silva, 2004). As características biogeoquímicas das águas do Rio Paraguai superior são fortemente influenciadas pelo seu contato com a planície aluvial do Pantanal (Hamilton et al., 1997).

Até o presente momento, apenas as águas do Rio Paraguai na região urbana da cidade de Corumbá, região a montante de Cáceres, foi avaliada quanto à genotoxicidade. De acordo com Moraes e Jordão (2001), esta cidade também não possui sistema de tratamento de esgotos. As descargas recebidas por esta galeria, unidas pelas águas de chuva, chegam ao Rio Paraguai como um destino final. O aumento da atividade humana, nas águas do Rio Paraguai, coloca em risco o equilíbrio ecológico resultando em uma irreparável perda do patrimônio genético. Estas águas demonstraram atividade genotóxica para *Allium cepa*, pelo TMN, sendo que o ciclo de cheia e seca influenciou nos níveis de genotoxicidade dos componentes do Rio Paraguai. Durante a estação de seca, estas influências foram detectadas pelo aumento significativo no índice mitótico, e, possivelmente como consequência disto, pelo aumento nas frequências de aberrações em raízes tratadas com esta água.

De Cáceres, cidade turística (pesca) situada a 210 Km da capital Cuiabá (MT), até Corumbá, no estado de Mato Grosso do Sul, o Rio Paraguai é navegável, existindo neste trecho, a Hidrovia Paraguai-Paraná, cujos impactos são objetos de avaliações e questionamentos.

1.3.2 – Cáceres

Cáceres é uma cidade turística que se localiza a margem esquerda do Rio Paraguai, nas coordenadas 16°11'42" latitude sul e 57°40'51' longitude oeste (www.caceres.mt.gov.br). O Estado de Mato Grosso caracteriza-se por ter três biomas distintos: Cerrado, floresta tropical Amazônica e Pantanal (Añez e Guarim Neto, 2000; Costa et al., 2004) e uma importante diversidade na fauna e na flora (Costa et al., 2004). O município de Cáceres está demarcado pela presença de 30% de seu território físico em Cerrado e 50 % de suas terras estão no Pantanal (Añez e Guarim Neto, 2000), cujo trimestre mais chuvoso é janeiro/fevereiro/março, quando se dá a formação de cheias na região de Cáceres (Carvalho, 1986). A montante da cidade Cáceres, cerca de 40 Km, o Rio Paraguai já apresenta áreas marginais brejosas de 4 Km de largura, sujeitas a inundação. A jusante de Cáceres, esta faixa de inundação é mais estreita até Descalvados, quando o rio muda de direção e depois se bifurca. Neste lugar é que começa a área real do pantanal do Paraguai, com pequenos lagos em ambos os lados do rio, numa faixa de 25 km de largura.

Cáceres apresenta vários agentes estressantes ambientais aquáticos que podem afetar espacialmente e temporalmente a harmonia ambiental. Para Iocca (2000), a cidade de Cáceres conhecida como Portal do Alto Pantanal, tem sofrido, nas últimas décadas, crescimento desordenado na região urbana e no entorno, motivado pela expansão das atividades agropecuárias e expansão urbana. Este crescimento tem provocado impactos ambientais com reflexos diretos na qualidade de vida da população. De acordo com Augustinho e Ferreira (2004), em Cáceres não existem sistemas de tratamento dos dejetos urbanos, todos os esgotos sanitários são lançados no Rio Paraguai. Entretanto, mesmo diante da importância por fazer parte do maior ecossistema alagável do mundo, não despertou sobre o mal que estes efluentes sanitários podem causar aos mananciais de água potável, e conseqüentemente, todo o sistema pantaneiro sofre em decorrência das águas que chegam até o Pantanal, muitas vezes poluídas e contaminadas.

Além dos efluentes dos esgotos sanitários, as águas do Rio Paraguai recebem diretamente ou indiretamente efluentes agro-industriais (efluentes

residuais de frigorífico, curtumes de couro e laticínios). Ainda, anualmente, é realizado em Cáceres, o Festival Internacional de Pesca, maior campeonato de pesca de água doce do mundo, que de acordo com o presente estudo, também tem contribuído para o agravamento dos impactos no rio Paraguai.

1.3.3 – Metodologia de Estudo: Coletas e caracterização dos sítios de estudo.

As coletas foram feitas em quatro períodos: setembro de 2003; abril de 2004; agosto de 2004; e Março de 2005, sendo duas coletas em período de águas baixas (seca), setembro de 2003 e agosto de 2004, e duas em águas altas (cheia) abril de 2004 e março de 2005, pela equipe de coletas, conforme Figura 4. Foram coletadas águas de superfície e avaliadas as características físico-químicas, em todas as coletas no Rio Paraguai, no trecho da cidade de Cáceres – MT em quatro sítios: 1, 2, 3 e 4, conforme Figura 5. De acordo com (Hamilton et al., 1996), em março e abril é o cume do período de inundação regional. Foram realizadas, também, coletas de sangue de peixes (esfregaços) das espécies *Pimelodus maculatus* (mandi) e *Leporinus friderici* (piauí), nas coletas realizadas em abril e agosto de 2004, sendo período de cheia e seca, respectivamente.

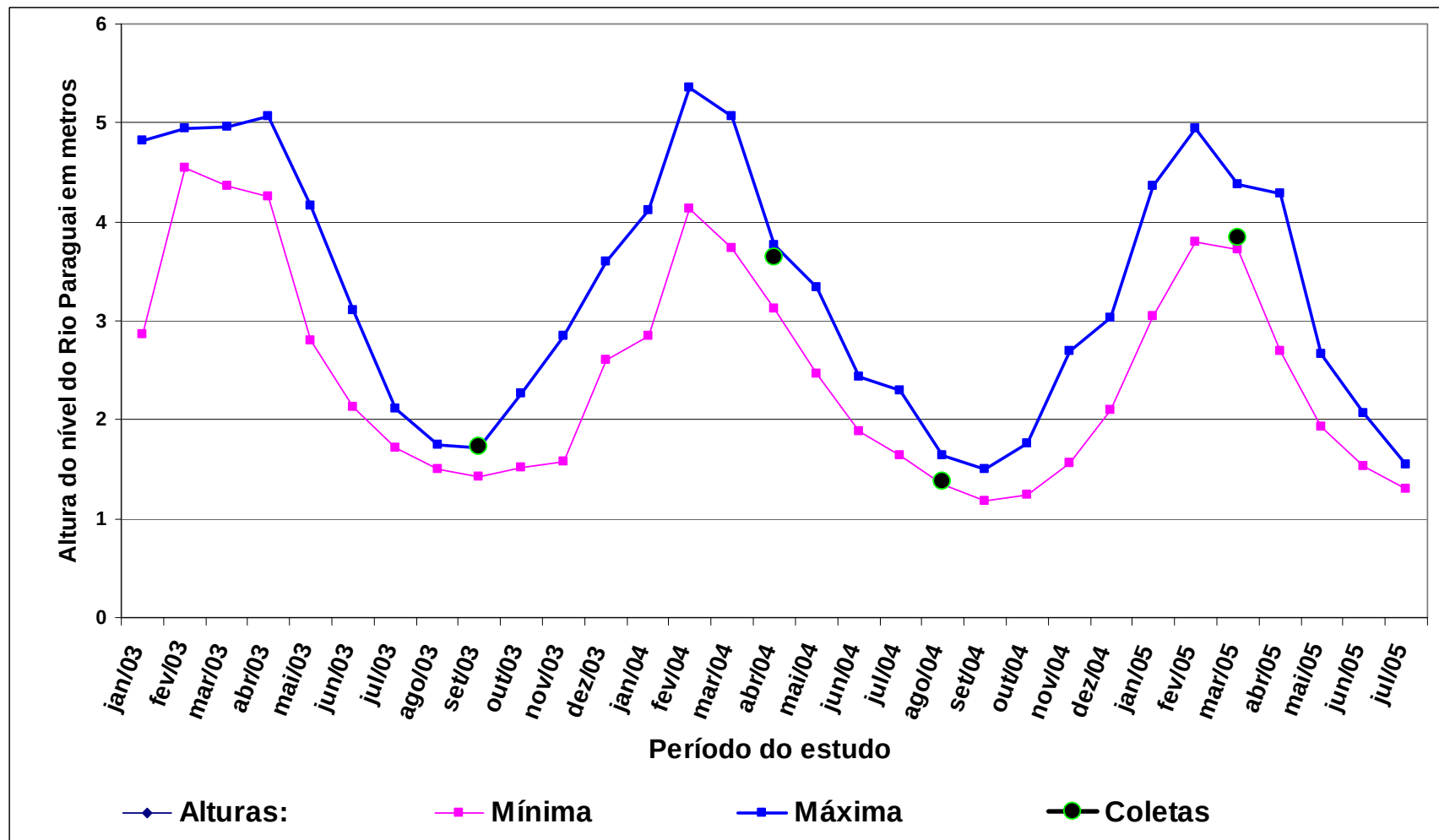


Figura 4 – Alturas do nível das águas do Rio Paraguai: máxima, mínima em cada mês e no dia da coleta – Dados: Agência Fluvial de Cáceres/ Marinha

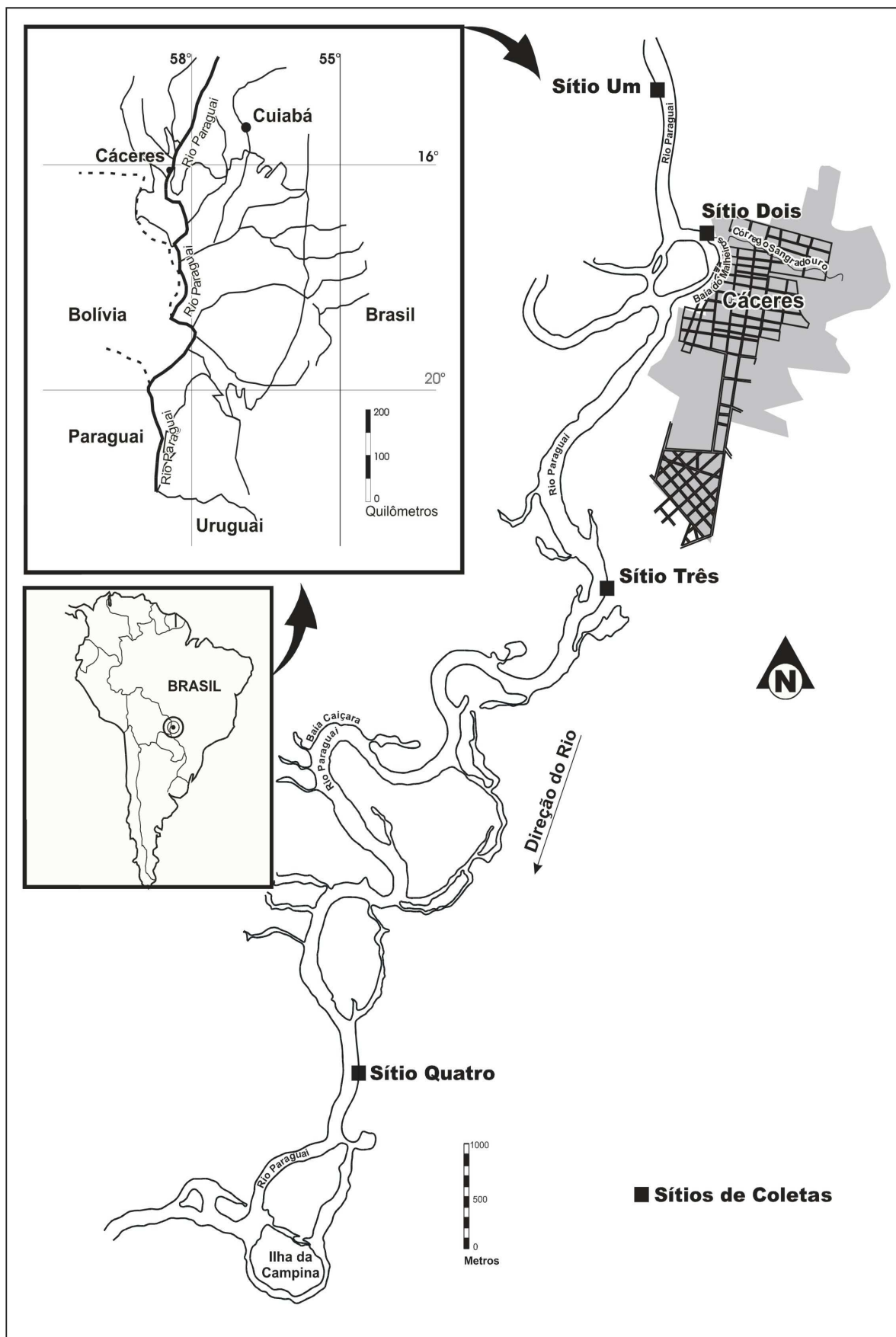


Figura 5 – Localização dos sítios de coletas.

1.3.3.1 - Sítios: características específicas.

Sítio 1 – Local a montante ao perímetro urbano, usado como referencial, inclusive para o Teste de micronúcleos em Peixes. Considerado não poluído por este estudo. Situa-se a 1.200 metros à montante do sítio 2, conforme Figura 6.



Figura 6- Sítio 1 em período de cheia (15/03/2005).

O Festival Internacional de Pesca (FIP) é realizado anualmente e organizado pela Prefeitura municipal (Secretaria Municipal de Turismo), com o apoio da Secretaria Estadual de Turismo e empresários. Realizado desde 1980, o festival se tornou um dos maiores eventos de pesca embarcada do mundo. Atualmente, o FIP é muito mais que uma prova de pesca embarcada (barco e canoa), que normalmente conta com grande número de barcos motorizados e uma prova de pesca de barranco (infanto-juvenil). Durante a semana do FIP acontecem várias atrações culturais e esportivas como campeonatos de vôlei de praia, futebol de areia, shows nacionais e regionais, oficinas de artes e de pesca (www.fipcaceres.com.br). O evento é centralizado no Rio Paraguai, na Baía do Malheiros, conforme mostra a Figura 7.



Figura 7 - Baía do Malheiros (www.caceres.mt.gov.br).

Sítio 2 – Local do efluente Córrego Sangradouro, que deságua na Baía do Malheiros, perímetro urbano, baía situada no Rio Paraguai, receptor de efluentes de esgotos sanitários de vários tipos e origens diversas. A localização é GPS = S 16° 03' 40,9" W 57° 41' 19,7", conforme mostram as Figuras 8 (cheia) e 9 (seca).



Figura 8 - Sítio 3: Córrego Sangradouro em período de cheia – (15/03/2005)



Figura 9 - Sítio 3 – Córrego Sangradouro em período de seca – (29/08/2004).

Sítio 3 – Local onde são liberados efluentes de frigorífico de grande porte. Situa-se a 4.500 metros à jusante do ponto dois, deságua diretamente no Rio Paraguai, conforme Figura 10.



Figura 10 - Sítio 2 - Efluente do Frigorífico em período de seca (29/08/2004).

Sítio 4 – Local onde são liberados os efluentes de curtume de couro de grande porte. Situa-se a 11.500 metros a jusante do ponto dois, deságua diretamente no Rio Paraguai, conforme figura 11. Para Matsumoto et al. (2006), águas de sítios com efluentes de descargas de curtume produzem altas frequências de anormalidades nucleares e de micronúcleos, em teste de micronúcleos em peixes. De acordo com Al-Sabti et al. (1994), a principal fonte de poluição de água por cromo são os resíduos de produtos da indústria de couro. Os sítios 3 e 4 são a jusantes do perímetro urbano. Na coleta do dia 29/08/2004 havia desconectado uma parte da manilha que levava os efluentes ao fundo do rio. Os efluentes estavam esbranquiçados e mal cheirosos, inclusive havia vários peixes mortos à jusante deste sítio, conforme figura 12.



Figura 11 - Sítio 1 – Manilha que leva os efluentes do curtume de couro, para o fundo do rio, em período de seca (29/08/2004).



Figura12 - Sítio 1 – Manilha que leva os efluentes do curtume de couro para fundo do rio quebrado (29/08/2004).

1.4 – Referências

Abdo MSA, Silva CJ. 2004. Limnological characteristics of the water bodies of the Corutuba Nesting Site in Brazil's Pantanal. *Acta Limnologica Brasiliensia* 16(4): 359-368.

Al-Sabti K, Franko M, Andrijani B, Knez S, Stegnar P. 1994. Chromium-induced micronuclei in fish. *Journal of Applied Toxicology* 13(5): 333-336.

Amaral VS, Silva RM, Reguly ML, Andrade HHR. 2005. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutation Research* 583(1): 67-74.

Amaral VS, Sinigaglia M, Reguly ML, Andrade HHR. 2006. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Environmental Pollution* 139: 469-476.

Andrade VM, Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, Freitas TRO. 2004. 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* 44: 459–468.

Añez RS, Guarim Neto G. 2000. O uso de plantas medicinais na comunidade do Garcês, Cáceres, MT. Simpósio Sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, 3. 2000, Corumbá, Os desafios do Novo Milênio. Resumos. Corumbá: Embrapa Pantanal, 469p.

Assine ML, Soares PC. 2004. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International* 114: 23–34.

Augustinho L, Ferreira AR. 2004. Impactos ambientais dos efluentes líquidos hospitalares no rio Paraguai, Cáceres, MT. In: RESUMOS - IV Simpósio Sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal – Sustentabilidade Regional – De 23 a 26 de novembro de 2004 em Corumbá MS – Embrapa Pantanal.

Bresler C, Bissinger V, Abelson A, Dizer H, Sturm A, Kratke R, Fishelson L, Hansen P-H. 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research* 53: 219–243.

Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Do'rr AJM, Rizzoni M. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research* 557: 119–129.

Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26(1): 99-103.

Carrasco KR, Tilbury KL, Mayers MS. 1990. Assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminants effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47: 2123-2136.

Carvalho NO. 1986. Hidrologia da Bacia do Alto Paraguai. In: *Anais do Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal*, Corumbá, Embrapa, Brasília: 1: 43-48.

Çavas T, Ergene-Gözükara S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538(1-2): 81–91.

Çavas T, Ergene-Gözükara S. 2005a. Micronucleus Test in Fish Cells: A Bioassay for *In Situ* Monitoring of Genotoxic Pollution in the Marine Environment. *Environmentol ond Molucolor Mutagenesis* 46(1): 64-70.

Çavas T, Ergene-Gözükara S. 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74(3): 264–271.

Catella AC. 1992. Estrutura da comunidade e alimentação dos peixes da Baía da Onça, uma lagoa do Pantanal do Rio Aquidauana, MS. Campinas: UNICAMP. Dissertação de Mestrado.

Chung HW, Kang SJ, Kim SY. 2002. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutation Research* 516: 49–56.

Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ. 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research* 410: 237–243

Costa KF, Brito RM, Miyazawa CS. 2004. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 27(2): 187-190.

Cristaldi M, Ieradi LA, Udriou I, Zilli R. 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutation Research* 559: 1–9.

Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Martelo R, Graf U, Villalobos-Pietrini R, Gomez-Arroyo S. 1995. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 341: 235-247.

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

Dihl RR, Silva CGA, Amaral VS, Reguly ML, Andrade HHR. 2008. Mutagenic and recombinagenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP, organic extracts in the *Drosophila* wing-spot test. *Environmental Pollution* 151(1): 47-52.

Ergene S, Çavas T, Çelik A, Köleli N, Aymak C. 2007. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis*. Disponível em <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/-> em 14/06/2007.

Farah MA, Ateeq B, Ali MN, Ahmad W. 2003. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 25–29.

FEMA, 2003. Projeto Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado de Bacia Hidrográfica para o Pantanal e Bacia do Alto Paraguai - Agencia Nacional das Águas/Fundo para o Meio Ambiente Mundial/Programa das

Nações Unidas para o Meio Ambiente/Organização dos Estados Americanos. Resumo Executivo do Relatório Final. Disponível em www.ana.gov.br/gefap - Componente III, acesso em 20/07/2006.

Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland MN, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 534(1-2): 65-75.

Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, Ribeiro CO; Cestari MM. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology* 27(1): 103-107.

Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* 317: 207–233.

Formigli LM, Ferrari I, Grisolia CK. 2002. Evaluation of genotóxic and cytotoxic potential of thiola (N-2-Mercaptopropionylglycine), a medicine used in the treatment of humans contaminated with mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 39: 18-21.

Frölich A, Wüglér FE. 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research* 216: 179-187.

Frölich A, Wüglér FE. 1990. *Drosophila* wing spot test: Improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research* 234:71–80.

Girard P, Da Silva CJ, Abdo M. 2003. River–groundwater interactions in the Brazilian Pantanal. The case of the Cuiabá River. *Journal of Hydrology* 283: 57–66.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6: 153–188.

Graf U, Frei H, K"agi A, Katz AJ, W"urgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 222: 359–373.

Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 271: 59–67.

Graf U, Singer D, 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 8:15–27.

Grisolia CK, Cordeiro CMT. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology* 23(1): 235-239.

Grisolia CK, Starling FLR. 2001. Micronuclei monitoring of fish from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research* 491: 39-44.

Grover IS, Kaur S.1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research* 426: 183–188.

Guzmán-Ricón, J and Graf, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: *Biomonitoring and*

Biomarkers a Indicators of Environmental Change. New York: Edit by F. M. Butterworth et al., Phenunm Press. p.169-181.

Halltröm I, Blank, A. 1985. Genetic regulation of the cytochrome P – 450 – dependent reactions. *Chemico-biological Interactions* p. 157-171.

Hamilton SK, Sippel SJ, Melack JM. 1996. Inundation patterns in the Pantanal Wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. *Archiv fuer Hydrobiologie* 137: 1-23.

Hamilton SK, Sippel SJ, Calheiros DF, Melak JM. 1997. Na anoxic event and other biogeochemical effects of the Pantanal wetland on the Paraguay River. *Limnnology Oceanography* 42(2): 257-272.

Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinai N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N, Sofuni T, Ojima Y. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic Organisms. *Mutation Research* 399: 125–133.

Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys Ph, MacGregor JT. 1991. Micronuclei as an Index f Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 18: 277-291.

Iocca FA. 2000. Caracterização Limnológica do Córrego Sangradouro nas épocas de seca e de chuva - Cáceres/MT. Dissertação de mestrado – Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, 57 p.

Jaylet A, Deparis P, Ferrier V, Grinfeld S, Siboulet R. 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Research* 164(4): 245-257.

karekar V, Joshi S, Shinde SL. 2000. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. Mutation Research 468: 183-194.

Krumschnabel G, Nawaz M. 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. Aquatic Toxicology 70: 159–167.

Kuno R. Avaliação da contaminação por mercúrio em peixes do Alto Pantanal-Mato Grosso-Brasil. São Paulo, 2003. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 99p.

Lajmanovich RC, Cabagna M, Peltzer PM, Stringhini GA, Attademo AM. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (*Amphibia: Hylidae*) exposed to insecticide endosulfan. Mutation Research 587: 67–72.

Levario-Carrillo M, Sordo M, Rocha F, González-Horta C, Amato D, Ostrosky-Wegman P. 2005. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. Mutation Research 586(1): 68-75.

Lindsley DL, Zimm GG. 1992 The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego: Academic Press, 1133 p.

Ma TH, Xu Z, Xu C, Heike McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. Mutation Research 334: 185-195.

Maffei F, Fimognari C, Castelli E, Stefanini GF, Fort GC, Hrelia P. 2000. Increased cytogenetic damage detected by FIH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. Mutagenesis 15(6): 517-523.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC; Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using

the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 148-158.

Mersch, Beauvais MN. 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research* 393: 141-149.

Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367: 245–251.

Moraes DSL, Jordão BQ. 2001. Evaluation of the genotoxic potential of municipal waste water discharged into the Paraguay River during periods of flood and drought. *Environmental Toxicology* 16(2): 113-116.

Nepomuceno JC, Ferrari I, Spanó MA, Centeno AJ. 1997. Detection of Micronuclei in Peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 293-297.

Ohe T, White PA, DeMarini DM. 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutation Research* 534: 101–112.

Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review, *Mutation Research* 567: 109–149.

Oliveira S, Pasqual A. 2004. Avaliação de parâmetros indicadores de poluição por efluente líquido de um aterro sanitário. *Engenharia Sanitária e Ambiental* 9(3): 240-249.

Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Grisolia CK, Paumgarten. 2006. Método multigeração para avaliação dos efeitos de poluentes sobre a reprodução de caramujos de água doce. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 1(2): 115-118.

Palhares D, Grisolia CG. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. Genetics and Molecular Biology 25(3): 281-284.

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Spanó MA. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil. Environmental and Molecular Mutagenesis 47(3): 219-224.

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Pavanin LA, Graf U, Rezende AAA, Valadares BLB, Fragiorgio EJ, Souza NC, Gutierrez ZR, Spanó MA. 2007. Assessing the Impact of Pollution on the Japaratuba River in Brazil Using the Drosophila Wing Spot Test. Environmental and Molecular Mutagenesis 48(2): 96-105.

PNMA: 1997: Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) – Volume 1 – Programa Nacional do Meio Ambiente, Brasília.

Prá D, Lau AH, Knakiewicz T, Carneiro FR, Erdtmann B. 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. Mutation Research 585(1-2): 79-85.

Reifferscheid G, Grummt T. 2000. Genotoxicity in German surface waters - results of a collaborative study. Water, Air, and Soil Pollution 123: 67–79.

Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. Ecotoxicology and Environmental Safety 57: 168–174.

Sanchez-Galan S, Linde AR, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. 2001. Induction of Micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 139-143.

Sarıkaya R, Çakır S. 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 424–430.

Schmid W. 1975. The Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis in: Hollanender, A. Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection. Plenum Press. New York and London. 4(36): 31-53.

Silva CJ. 2000. Ecological basis for the management of the Pantanal – Upper Paraguay River Basin. In: Smits AJM, Nienhuis PH. Leuven, RSEW. (Eds), New approaches to river management, Backuys Publishers, Leiden, pp. 97-117.

Silva MP, Mauro R, Mourão G, Coutinho M. 2000. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. *Revista Brasileira de Botânica* 23(2): 143-152.

Spanó MA, Frei H, Würgler FE, Graf U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16: 385–394.

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-/149.

Vargas VMF, Ducatti A, Horn RC. 2001. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. In Tucci, C. E. M. and Marques, D. M. L. M. (eds), Avaliação e controle da Drenagem Urbana. ABRH, Porto Alegre, vol. 2, p. 548.

Vogel EW 1987. Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis* 2: 161-171.

Wang H. 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutation Research* 426:147–149.

White PA, Rasmussen JB. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research* 410: 223–236.

White PA. 2004. The sources and potential hazards of mutagens in complex environmental matrices. *Mutation Research* 567: 107–108.

White PA, Claxton LD. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research* 567: 227–345.

Zani C, Feretti D, Buschini A, Poli P, Rossi C, Guzzella L, Caterino FD, Monarca S 2005. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutation Research* 587: 26–37.

www.caceres.mt.gov.br; www.fipcaceres.com.br – visitada em 04/08/2006.

CAPÍTULO 2 - MANUSCRITO:
GENOTOXICIDADE DA ÁGUA DO RIO PARAGUAI, CÁCERES –
MT, BRASIL, PELO TESTE DA MANCHA EM ASAS DE
Drosophila melanogaster

**GENOTOXICIDADE DA ÁGUA DO RIO PARAGUAI, CÁCERES – MT,
BRASIL, PELO TESTE DA MANCHA EM ASAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

**Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta^{1,2}, Júlio César Nepomuceno², Luiz
Alfredo Pavanin³**

¹**UNEMAT - Universidade do Estado de Mato Grosso, Instituto de Ciências
Naturais e Tecnológicas, *Campus* Cáceres – MT, Brasil**

²**UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e
Bioquímica, Campus Umuarama, Uberlândia – MG, Brasil**

³**UFU – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Campus
Santa Mônica, Uberlândia – MG, Brasil**

**Correspondence to: Júlio César Nepomuceno, Universidade Federal de
Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av.
Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brasil.**

E-mail: nepomuceno@ufu.br Phone: +55 (34) 32182505; Fax: +55 (34) 32182203.

RESUMO:

A atividade genotóxica de amostras de águas superficiais, de quatro sítios ao longo do Rio Paraguai em Cáceres, Estado de Mato Grosso, Brasil, foi avaliada utilizando o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. Efluentes dos esgotos sanitários e agro-industriais (efluentes residuais de frigorífico, curtumes de couro, laticínios) são jogados diretamente ou indiretamente no Rio Paraguai. As coletas de água foram feitas em quatro vezes, Setembro de 2003 e agosto de 2004 (período de seca) e abril de 2004 e março de 2005 (período de cheia), em 4 sítios sendo 3 em locais considerados mais poluídos. Foram encontrados nos Sítios 2, 3 e 4 concentrações de sulfetos; cromo e óleos e graxas em todos os sítios, acima dos limites permitidos. Os resultados do teste SMART, para os descendentes do cruzamento padrão (ST), demonstraram respostas genotóxicas positivas apenas nas amostras do Sítio 4, na coleta feita agosto de 2004 e na coleta feita no Sítio 3 em março de 2005. Os descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) foram mais sensíveis, com aumentos de manchas mutantes em todas as amostras do Sítio 1; nas amostras do Sítio 3 (coletas feitas em setembro de 2003 e abril de 2004; nas amostras do Sítio 2 (coletas feitas em setembro de 2003 e agosto de 2004. A comparação feita entre as frequências de manchas, dos indivíduos trans-heterozigotos marcados com os heterozigotos balanceados, indicam que respostas positivas para a genotoxicidade (sítio 2= coleta set/2003; sítio 3= coleta abr/2004), foram devido a recombinação mitótica. Portanto, as águas do Rio Paraguai, no perímetro urbano de Cáceres, recebem efluentes genotóxicos.

Palavras-chave: Cáceres; Teste SMART; Rio Paraguai; Genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

O Pantanal, a maior planície inundável do mundo, com uma área aproximada 138.183 Km², é composto de um mosaico de ambientes diferentes, que sustenta a biodiversidade aquática e terrestre. O equilíbrio frágil dos ecossistemas de Pantanal, mantido pelo pulso de inundação, é ameaçado pela nova direção de crescimento econômico, principalmente modificação da geometria hidráulica do rio pelo desmatamento e alterações da área naturais. Estas tendências são mais evidentes na área de captação da bacia do Paraguai, onde as águas fluem ao Pantanal (Silva, 2000). O Rio Paraguai é o principal tributário da Bacia do Alto Paraguai (Assine e Soares, 2004). Suas águas fluem ao longo do lado ocidental do Pantanal, colecionando água de vários tributários como também de contribuições difusas da planície inundável (Hamilton et al., 1997).

A Bacia do Rio Paraguai tem suas cabeceiras primárias na região de Planalto dos Parecis, o grande divisor de águas entre a bacia Amazônica e Platina, no Estado de Mato Grosso, drenando as regiões de Depressão e Planície do Pantanal mato-grossense, em direção ao Paraguai e Argentina. Nesse percurso, o rio Paraguai drena diversos ambientes e formações vegetais variadas, desenvolvendo-se em uma das regiões com maior riqueza e diversidade de espécies vegetais e animais (FEMA, 2003).

A cidade de Cáceres, conhecida como Portal do Alto Pantanal, tem sofrido, nas últimas décadas, crescimento desordenado na região urbana e no entorno, motivado pela expansão das atividades agropecuárias e expansão urbana. Este crescimento tem provocado impactos ambientais com reflexos diretos na qualidade de vida da população (Iocca, 2000). O crescimento desordenado da região urbana leva ao lançamento de efluentes dos esgotos sanitários e agro-industriais (efluentes residuais de frigorífico, curtumes de couro e laticínios) diretamente ou indiretamente no Rio Paraguai, pois, não existe tratamento de esgoto sanitário. Ainda, anualmente, é realizado em Cáceres, o Festival Internacional de Pesca, maior campeonato de pesca de água doce do mundo, que também contribui para o agravamento dos impactos no rio Paraguai.

Os impactos ambientais provenientes dos metais pesados são mais preocupantes do que as excessivas cargas orgânicas degradáveis (Oliveira e Pasqual, 2004), além do processo de eutrofização (Lorenzetti 2002). Contaminantes como hidrocarboneto de petróleo, metais pesados e praguicidas podem causar efeitos tóxicos diretos, quando libertado em ambientes aquáticos (Fleeger et al., 2003), inclusive genotóxicos (Çakir e Sarikaya, 2005). Águas residuais urbanas (sanitárias) contêm os agentes de mutagênico com ação direta em material genético (Ohe et al., 2003).

Nos últimos anos, vários testes isolados ou associados foram empregados para monitorarem ambientes ou avaliar o dano biológico, causado pela exposição de organismo teste a vários agentes genotóxicos presentes nas águas poluídas. Entre eles, o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em asas de *Drosophila melanogaster* (SMART), foi utilizado por Delgado-Rodriguez et al. (1999), Amaral et al. (2005), Amaral et al. (2006), Pantaleão et al. (2007), Dihl et al. (2008), mostrando-se eficaz para avaliação de genotoxinas ambientais. Embora haja um grande número de testes de genotoxicidade, apenas um número relativamente pequeno é usado para a avaliação de misturas complexas (Claxton et al., 1998).

O SMART, descrito por Graf et al., (1984), tem sido empregado para investigar genotoxicidade de compostos simples (Frölich e Würigler, 1990b; Spanó et al., 2001), mas também avaliar a genotoxicidade de misturas complexas (Frölich e Würigler, 1990a), de várias origens (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Sousa et al., 2003; Sarakaya e Çakir, 2005). A versatilidade do SMART permite avaliar compostos estáveis e instáveis, como também possibilita testar não só compostos químicos, mas também compostos dissolvidos em água e no ar (Graf et al., 1984). O SMART se mostrou ser altamente sensível para descobrir os agentes genotóxicos presentes no ambiente aquático (Amaral et al., 2006), inclusive em águas fluviais (Pantaleão et al., 2007).

Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos das águas superficiais do Rio Paraguai em Cáceres – MT, pelo SMART. Tendo em vista, a deficiência de informação a respeito da genotoxicidade das águas do Rio Paraguai neste trecho, após receber

efluentes dos esgotos sanitários, agro-industriais, e efeitos genotóxicos da Hidrovia Paraná-Paraguai, bem como, dos impactos da ação turística.

MATERIAL E MÉTODOS

Controles: positivo e negativo

O Uretano (URE), (Etil carbamato; $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$; CAS N° 51-79-6; Fluka, Buchs, Switzerland), foi usado como controle positivo, por ser um agente genotóxico, dose dependente, tanto no cruzamento padrão, como no cruzamento de Alta Bioativação, em asas de *Drosophila melanogaster* (Frölich e Würigler, 1990b). A concentração de URE 10 mM foi preparada em água destilada. Água destilada foi empregada como controle negativo.

Sítios selecionados e coletas de água

Cáceres é uma cidade situada à margem esquerda do Rio Paraguai, coordenadas 16°11'42" latitude sul e 57°40'51' longitude oeste, 118 metros acima do nível do mar, a 209,7 quilômetros da capital Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil (www.caceres.mt.gov.br), conforme Figura 1. Amostras de água superficial do Rio Paraguai foram coletadas em quatro sítios próximos a cidade de Cáceres – MT. Duas das coletas foram feitas em período de águas baixas (seca), setembro de 2003 e agosto de 2004 e duas durante o período de águas altas (cheia), abril de 2004 e março de 2005. Março e abril são considerados os meses de inundação regional (Hamilton et al., 1996).

Sítios:

- 1) - a montante ao perímetro urbano, usado como referência. Situa-se a 1.200 metros a montante do sitio dois.
- 2) - local do efluente Córrego Sangradouro, que deságua na Baía do Malheiros, perímetro urbano, efluentes de esgotos urbanos. Recebem todos os tipos de dejetos urbanos. GPS: S 16°03' 40,9" W 57°41' 1 9,7".
- 2) - local onde são liberados efluentes de frigorífico de grande porte. Situa-se a 4.500 metros a jusante do ponto dois;
- 4) - local onde são liberados os efluentes de curtume de grande porte; situa-se a 11.500 metros a jusante do ponto dois. Os sítios 3 e 4 são a jusantes ao perímetro urbano.

As amostras de água foram coletadas em tubos de polipropileno, congeladas, transportadas do Laboratório de Citologia da UNEMAT/Campus Cáceres para o Laboratório de Mutagênese/INGEB/UFU, onde ocorreram os tratamentos em duas etapas.

Análises físico-químicas das amostras de água

Foram coletados *in loco* os dados de altura do nível das águas do rio, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutibilidade elétrica e turbidez, em cada coleta. Os parâmetros sulfetos, cromo, sólidos suspensos, demanda bioquímica do oxigênio, demanda química de oxigênio, óleos e graxas, sólidos sedimentados, foram analisados nas amostras de água coletadas em agosto de 2004 e março de 2005, no Laboratório de Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART):

Linhagens e cruzamentos

O SMART possibilita detectar vários eventos genotóxicos na geração (F_1), pela expressão fenotípica de marcadores genéticos: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr³*, 3-38,8), localizados no cromossomo 3 de células do disco imaginal de asas em larvas de *Drosophila melanogaster*, visíveis na superfície da asa da mosca adulta. O teste é baseado no princípio da perda da heterozigose para estes marcadores (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Foram realizados dois tipos de cruzamentos: 1 - Padrão (ST), fêmeas virgens *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* foram cruzadas com machos *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) (Graf et al., 1989); 2 – Alta Bioativação (HB), fêmeas virgens *ORR/ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* foram cruzadas com machos (*mwh/mwh*) (Graf e van Schaik, 1992). A linhagem *ORR* (*Oregon R*) é sensível, devido ter cromossomos 1 e 2 da linhagem *Oregon* (R), resistente ao DDT, o que confere alta expressão constitutiva de enzimas citocromo P450 (Hålstrom e Blanck, 1985).

De ambos os cruzamentos, nascem dois tipos de descendentes: com o trans-heterozigoto marcado (MH) e heterozigoto balanceado (BH). Os descendentes são fenotipicamente distintos, baseado no marcador *TM3, Bd^s*.

As moscas adultas MH (*mwh* *+/+ flr*³) apresentam asas normais com bordas lisas, enquanto moscas BH (*mwh* *+/+ TM3, Bd*^s), que por portar um cromossomo balanceador, com múltiplas inversões e um marcador dominante (*TM3, Bd*^s), apresentam asas com bordas serrilhadas, denominadas serate (Guzmán-Rincón e Graf, 1995). A comparação entre as frequências de manchas observadas nos descendentes desses dois genótipos possibilita quantificar a ação recombinogênica do agente testado (Lehmann et al., 2003).

Coletas de ovos, tratamento das larvas e análise das asas

Os cruzamentos ST e HB foram realizados simultaneamente. Ovos destes dois cruzamentos foram coletados por 8 horas em frascos contendo base de ágar sólida (4% w/v ágar-ágar em água), coberta por uma camada de meio preparado com fermento biológico e enriquecido com açúcar. Larvas de três dias de vida, no terceiro estágio de desenvolvimento embrionário, foram lavadas em água corrente e transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata instantâneo (Yoki Alimentos, São Bernardo do Campo, Brasil), reidratado com 5 mL de amostras de águas não diluídas (integrais) do Rio Paraguai dos diferentes sítios. Foram usados como controles negativos, água deionizada e águas do sítio 1 (referência). Todo o tratamento foi realizado a (25 ± 1) ° C e 65% de umidade relativa.

Após metamorfose, as moscas adultas foram coletadas e acondicionadas em frascos contendo etanol 70%. Os pares de asas foram destacados das moscas e foram montadas em lâminas de microscopia de vidro, em solução de faure (30 g de goma arábica, 20 mL glicerol, 50 g hidrato cloral, 50 mL água). As manchas foram analisadas com ampliação de 400 X (Graf et al., 1984; Graf et al., 1989).

Nas asas dos descendentes MH podemos observar dois tipos de manchas: 1 - simples (*mwh* ou *flr*³), sendo as *mwh* mais frequentes, são produzidas por mutação de ponto, aberração cromossômica e crossing-over mitótico; 2 - gêmeas (pêlos múltiplos adjacentes a pêlos flare) são produzidas exclusivamente por recombinação somática (Graf et al., 1984; Frei e Würgler, 1996). Nos descendentes BH, é possível detectar apenas eventos mutacionais,

vez que devido o cromossomos balanceador ter múltiplas inversões, os produtos da recombinação mitótica são inviáveis, (Graf et al., 1984).

Análise estatística

Os resultados das frequências de manchas por mosca tratadas foram comparados com o controle negativo (água destilada), usando o teste binomial condicional de Kastenbaum and Bowman (1970), com $\alpha = 0,05$, cujos diagnósticos são: positivo, fraco-positivo, negativo ou inconclusivo (Frei e Würigler, 1988).

RESULTADOS

Os resultados dos dados físico-químicos, obtidos *in loco*, em cada coleta, estão na Tabela I. A Tabela II mostra os resultados das análises químicas das amostras de água, coletadas em agosto de 2004 e março de 2005. Tanto no período de seca (agosto de 2004) quanto de cheia (março de 2005) foram detectados sulfeto nos Sítios 2, 3 e 4. O nível mais alto foi encontrado no Sítio 4, no período de seca. Foram detectados, também, cromo em todas as amostras analisadas dos quatro sítios, bem como óleos e graxas na coleta de março de 2005.

Os resultados dos descendentes MH e BH do teste SMART, do Cruzamento ST estão nas Tabelas: III, IV, V, e VI. Houve aumentos, estatisticamente significativos, das frequências de manchas mutantes, nas amostras do Sítio 4, feitas em agosto de 2004 e, nas amostras do Sítio 3, feitas em março de 2005, quando comparadas com o controle negativo.

Enquanto que os do HB estão nas Tabelas: VII, VIII, IX, X e XI. Quanto aos descendentes MH do cruzamento HB, tratados com águas superficiais do Rio Paraguai, houve aumentos, estatisticamente significativos, nas frequências de manchas, em todas as coletas do sítio 4; nas coletas Set/2003 e Abr/2004 do sítio 3; Set/2003 e Ago/2004 do sítio 2 quando comparadas com o controle negativo.

Nas Figuras 2 e 3 mostram os gráficos dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB de todas as coletas por sítio.

A comparação dos descendentes MH e BH do cruzamento HB demonstrou que na coleta feitas no sítio 2 em Setembro de 2003 ocorreu 62,16% de eventos recombinogênicos, enquanto que no sítio 3 no período de Abril de 2004, ocorreram 58,40% de eventos recombinogênicos.

Em todas as coletas do sítio as coletas do sítio 1, os resultados de ambos cruzamentos foram negativos, quando comparados com o controle negativo água.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As observações físico-químicas da Tabela I indicam que foram claras as diferenças para todos os parâmetros observados, entre as várias amostras e entre os períodos de seca e cheia. Havendo variações em um mesmo tipo de período. Resultados similares foram verificados por Abdo e Silva (2004), em corpos d'água do ninhal Corutuba, Pantanal - MT, afluente do rio Paraguai, que apresentaram variações entre os períodos de cheia e estiagem. As diferenças entre os dois períodos foram significativas em relação à condutividade elétrica e à concentração de nutrientes nos corpos de água estudados. Os estudos de Iocca (2000), sobre caracterização limnológica do córrego Sangradouro, afluente do rio Paraguai no período urbano de Cáceres, demonstraram que os valores mais elevados foram obtidos na estiagem. Houve diferença significativa entre os períodos de seca e de chuva para as variáveis: material em suspensão total, orgânico, inorgânico; condutividade elétrica e pigmento total, devido ao efeito da diluição provocado pelas chuvas. Em todas as variáveis estudadas houve variação temporal e espacial. No presente estudo verifica-se que nas coletas de cheia de todos os sítios, o oxigênio dissolvido ficou muito abaixo do valor aceitável pela legislação brasileira ($\geq 5,0$), bem como a alta condutividade. A condutividade elétrica do sítio 2 foi mais alta que os outros sítios em todas as coletas, provavelmente devido ser constituído por efluentes sanitários.

Pela legislação brasileira (CONAMA, 2005), para águas de rio de classe 2, como é o caso do Rio Paraguai, é permitido valores de oxigênio dissolvido ≥ 5 mg/L; $\leq 0,002$ mg/L de sulfeto (S); $\leq 0,05$ mg/L de cromo (Cr) e óleos e graxas virtualmente ausentes. Logo, os valores de cromo, sulfetos e óleos e graxas que estão contidos na tabela II estão acima do aceitável pela legislação.

É possível que a matéria orgânica, na água, consuma o oxigênio ⁴⁴ provoque outros processos, criando uma situação de eutrofização na presença de sulfetos. A presença de cromo nos solos é responsável por um nível alto de toxicidade genética. Assim, o cromo pode ser altamente tóxico em sistemas biológicos e, para alguns indivíduos, age, também, como forte alérgeno (Wang, 1999). Cromo (III) em concentrações mais altas e em maior período de exposição é genotóxico (Çavas e Ergene-Gözükar, 2005), embora não tenha demonstrado genotoxicidade em SMART (Graf et al., 1992). O cromo (VI) é carcinógeno (Çavas e Ergene-Gözükar, 2005), intensamente tóxico (agudamente) para hepatócitos de peixe de aquário (Krumnschnabel e Nawaz, 2004) e é clastogênico em células de pulmão humano (Wise et al., 2004). Graf et al. (1992) verificaram que óxido de cromo (VI) foi altamente genotóxico em tratamentos crônicos e agudos em teste SMART. Na análise das asas dos descendentes portadores do cromossomo balanceador (BH), que elimina todos os eventos de recombinação, que mais de 90% das manchas induzidas por óxido de cromo (VI) foram devidos a eventos recombinogênicos mitóticos.

As amostras do sítio 1 não induziram aumentos, estatisticamente significativos nas frequências de manchas mutantes em nenhuma coleta e em nenhum cruzamento (ST e HB), quando comparadas com o controle negativo (água destilada). Isto provou ser sítio de referência, embora o sítio 4 apresentasse de 4 a 7 vezes mais a quantidade de cromo permitido pela legislação brasileira, não induziu aumentos significativos nas frequências de manchas mutantes. Possivelmente o cromo encontrado neste sítio, seja constituinte da composição geológica do solo, ou que esteja chegando neste sítio a partir de contaminações, a montante de Cáceres, pelo carreamento de fertilizantes para o rio, a partir de áreas agrícolas e pastagens, demonstrado por Laabs et al. (2002). É possível, também, que este cromo seja trivalente (cromo III) devido ao fato de não ter sido genotóxico em SMART (Graf et al., 1992).

As amostras do sítio 2 foram genotóxicas apenas para as coletas realizadas no período de seca, provavelmente devido às águas estarem mais concentradas de genotoxinas, enquanto que nas coletas do período de cheias, foram negativas. Além do cromo e sulfetos, detectados pelo presente estudo, os

efluentes deste sítio, contém lançamentos de efluentes sanitários de residências, hospitais, oficinas mecânicas, posto de gasolina (Iocca, 2000).

As análises dos resultados do sítio 3 demonstraram que os efluentes genotóxicos neste sítio não foram contínuos, porque apenas na coleta de março de 2005 (cruzamentos ST) e nas duas primeiras coletas (cruzamento HB) foram significativas. É possível que neste sítio, no momento da coleta, tenham chegado efluentes do frigorífico, muito concentrados, e que, também, poderiam conter genotoxinas transportadas pelas águas de outras fontes.

Na coleta de agosto de 2004 do sítio 4, as amostras de água foram coletadas exatamente no lugar onde ocorre a chegada dos efluentes do curtume, pois havia sido desconectado parte do tubo que leva os efluentes para o fundo do rio. A água era de aparência leitosa, apresentavam mau cheiro e alguns metros à jusante deste sítio, havia vários peixes mortos. Nas larvas de *Drosophila*, descendentes de ambos os cruzamentos (ST e HB), expostas à água deste sítio 1 (coleta de agosto de 2004) ocorreram reduções, em quase 60%, no número de eclosões, pós-metamorfose, portanto, estes efluentes foram citotóxicos e genotóxicos (respostas do SMART).

Ao analisar os indivíduos tratados com águas do sítio 3 coletada em março de 2005 e do sítio 4, coletadas em agosto de 2004, oriundas do cruzamento ST, verifica-se que as frequências dos descendentes BH foram estatisticamente inconclusivas. Por estes dados, é impossível verificar a contribuição dos eventos recombinogênicos para ação genotóxica. O mesmo fato ocorreu também nos indivíduos descendentes do cruzamento HB, tratados com águas do sítio 2 coletadas em agosto de 2004 e do sítio 4, coletadas em setembro de 2003 e abril de 2004.

De acordo com os estudos de Vila (2004), em *Piaractus mesopotamicus* (alterações morfofuncionais do fígado e micronúcleos em eritrócitos), cujas coletas realizadas em 2001 e 2002, as baías do Rio Paraguai circundantes a região de Cáceres, inclusive a montante da cidade, estão contaminadas por cromo (VI), sendo estes originários dos efluentes do curtume. Em contraste com nossa avaliação, neste estudo, não houve a realização da análise química da água.

É possível ainda, que a genotoxicidade das amostras de água, demonstrada no presente estudo, seja também devido à presença de sulfetos, encontrados nos sítios 1, 2 e 3. Pois, os sulfetos são comprovadamente genotóxicos, demonstrado por diversos pesquisadores, em diversos organismos teste (Rencüzgoullari et al., 2001; Yi e Meng, 2003; Meng et al., 2004; Yi et al., 2005).

Em resumo, o SMART foi capaz de detectar genotoxicidade nas amostras de água do Rio Paraguai em Cáceres e demonstrou que os descendentes do cruzamento HB foram mais sensíveis à genotoxicidade da água rio do que as moscas do cruzamento ST. A genotoxicidade foi limitada às amostras dos Sítios 2, 3 e 4, as quais receberam descargas contendo contaminantes potencialmente genotóxicos sanitários, da agricultura e agro-industriais. A atividade genotóxica foi detectada mais nos descendentes do cruzamento HB, demonstram assim, que as genotoxinas contidas nas águas são de ação indireta. As análises químicas das amostras de água detectaram a presença S, Cr e óleos e graxas, alguns dos quais são considerados genotóxicos. Sugere-se que o teste SMART seja mais amplamente explorado como um método rápido, sensível e de baixo custo na avaliação da genotoxicidade de ambientes aquáticos naturais.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT/ICNT/*Campus* Cáceres), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e Universidade Federal de Uberlândia pela aprovação do projeto. À equipe de coletas: Professor Ms. Claumir César Muniz, Professor Paulo Luiz da Silva, Sr. Heloísio José Benacchio, Marcelo Tomaz da Silva, Professora Renata Miranda Cebalho e Professora Josefa Silva dos Santos.

REFERÊNCIAS

Abdo MSA, Silva CJ. 2004. Limnological characteristics of the water bodies of the corutuba Nesting Site in Brazil's Pantanal. *Acta Limnologia Brasiliensia* 16(4): 359-368.

Amaral VS, Silva RM, Reguly ML, Andrade HHR. 2005. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutation Research* 583(1): 67-74.

Amaral VS, Sinigaglia M, Reguly ML, Andrade HHR. 2006. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Environmental Pollution* 139: 469-476.

Assine ML, Soares PC. 2004. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International* 114: 23–34.

Çakir S, Sarikaya R. 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology* 43: 443–450.

Çavas T, Ergene-Gözükara S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74: 264–271.

Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ. 1998. Minireview - Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research* 410: 237–243.

CONAMA, 2005 - Resolução Nº 357 de 17/03/2005 do Conselho Nacional de meio Ambiente. MMA. Brasil.

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

Dihl RR, Silva CGA, Amaral VS, Reguly ML, Andrade HHR. 2008. Mutagenic and recombinagenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP, organic extracts in the *Drosophila* wing-spot test. Environmental Pollution 151(1): 47-52.

FEMA, 2003. Projeto Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado De Bacia Hidrográfica Para O Pantanal E Bacia Do Alto Paraguai - Agencia Nacional das Águas/Fundo para o Meio Ambiente Mundial/Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente/Organização dos Estados Americanos. Resumo Executivo do Relatório Final. Disponível em www.ana.gov.br/gefap - Componente III, acesso em 20/07/2006.

Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. The Science of the Total Environment 317: 207–233.

Frei H, Würgler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutation Research 203: 297-308.

Frei H, Würgler FE. 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, Würgler FE. 1990a. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Research 234(2): 71-80.

Frölich A, Würgler FE. 1990b. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. Mutation Research 244(3): 201-208.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental Mutagenesis 6:153–188.

Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutation Research 222: 359–373.

Graf U, Heo OS, Ramirez OO. 1992. The genotoxicity of chromium(VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. Mutation research 266(2): 197-203.

Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Research 271: 59–67.

Guzmán-Rincón J, Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM et al., editors. Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. New York: Plenum Press. p 169–181.

Halltröm I, Blank A. 1985. Genetic regulation of the cytochrome P – 450 – dependent reactions. Chem. Biol. Interact p. 157-171.

Hamilton SK, Sippel SJ, Melack JM. 1996 Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. Archiv für Hydrobiologie 137: 1-23.

Hamilton SK, Sippel SJ, Calheiros DF, Melak JM. 1997. Na anoxic event and other biogeochemical effects of the Pantanal wetland on the Paraguay River. Limnology. Oceanography 42(2): 257-272.

Iocca FA. 2000. Caracterização Limnológica do Córrego Sangradouro nas épocas de seca e de chuva - Cáceres/MT. Dissertação de mestrado – Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília. 57 p.

Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9: 527-549.

Krumschnabel G, Nawaz M. 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 70: 159–167.

Laabs V, Amelung W, Pinto AA, Wantzen M, Da Silva CJ, Zech W. 2002. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. *Journal of Environmental Quality* 31: 1636-1648.

Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML, Andrade HHR. 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 539: 167–175.

Lorenzetti ML. 2002. Utilização de análise ecotoxicológicas no aprimoramento da avaliação da qualidade da água: aplicação do IVA – Índice de Qualidade da água para a proteção da vida aquática. Tese de Doutorado em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, 67p.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Bai J. 2004. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 19(6): 465-468

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Pavanin LA, Graf U, Rezende AAA, Valadares BLB, Fragiorgio EJ, Souza NC, Gutierrez ZR, Spanó MA. 2007. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the

Drosophila Wing Spot Test. Environmental and Molecular Mutagenesis 48(2): 96-105.

Rencüzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktas M. 2001. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. Mutation Research 490: 107–112.

Ohe T, White PA, DeMarini DM. 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. Mutation Research 534: 101–112.

Oliveira S, Pasqual A. 2004. Avaliação de parâmetros indicadores de poluição por efluente líquido de um aterro sanitário. Engenharia Sanitária e Ambiental 9(3): 240-249.

Sarıkaya R, Çakır S. 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. Environmental Toxicology and Pharmacology 20: 424–430.

Sousa NC, Carvalho S, Spanó MA, Graf U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extracts from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. Genetics and Molecular Biology 41: 293–299.

Silva CJ. 2000. Ecological basis for the management of the Pantanal – Upper Paraguai River Basin. In: Smits A.JM, Nienhuis PH, Leuven RSEW. (Eds). New approaches to river management. Backuys Publishers, Leiden, p. 97-117.

Spanó MA, Frei H, Würigler FE, Graf U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. Mutagenesis 16: 385–394.

Vila VB. 2004. Efeito da poluição aquática por cromo nos aspectos fisiológicos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) do Rio Paraguai, Cáceres/MT. Tese de Doutorado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas. Manaus – AM (Brasil) 116p.

Wang H. 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutation Research* 426:147–149.

Wise SS, Holmes AL, Ketterer ME, Hartsock WJ, Fomchenko E, Katsifis S, Thompson WD, John Wise JP, Sr. 2004. Chromium is the proximate clastogenic species for lead chromate-induced clastogenicity in human bronchial cells. *Mutation Research* 560(1): 79-89.

Yi H, Meng Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research* 537: 109–114.

Yi H, Liu J, Zheng K. 2005. Effect of sulfur dioxide hydrates on cell cycle, sister chromatid exchange, and micronuclei in barley. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 421–426.

www.caceres.mt.gov.br – acesso em 04/08/2006.

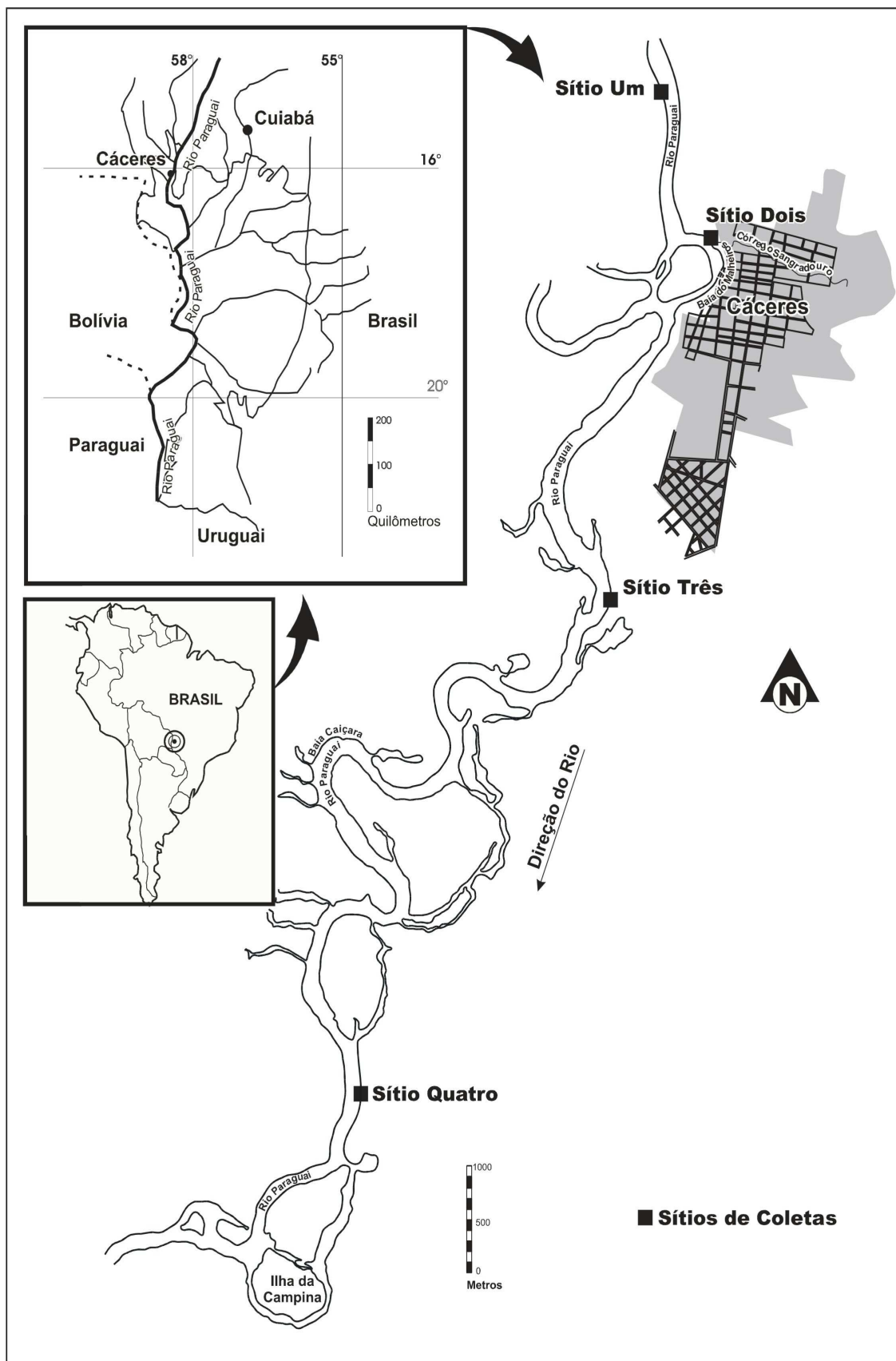


Figura1 - Localização do Rio Paraguai em Cáceres – MT, Brasil, mostrando os sítios de coletas utilizados neste estudo.

Tabela I - Análises físico-químicas conduzidas durante as coletas feitas no Rio Paraguai

	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4
Setembro de 2003				
Altura do nível do Rio (m)*	1.72	1.72	1.72	1.72
pH	6.90	6.82	6.85	6.92
Temperatura da água (°C)	26.3	27.1	26.3	26.2
Condutividade elétrica (µS.cm ⁻¹)	36	440	143	150
Oxigênio dissolvido ((mg.l ⁻¹))	7.18	+3.66	7.24	7.36
Turbidez (NTU)				
Abril de 2004				
Altura do nível do Rio (m)*	3.64	3.64	3.64	3.64
pH	7.30	6.70	9.0	8.25
Temperatura da água (°C)	28.7	29.1	28.9	28.8
Condutividade elétrica (µS.cm ⁻¹)	46	176	44	46
Oxigênio dissolvido ((mg.l ⁻¹))	+4.98	+1.42	+4.44	+4.60
Turbidez (NTU)	15	20	15	16
Agosto de 2004				
Altura do nível do Rio (m)*	1.38	1.38	1.38	1.38
pH	6.13	6.74	6.15	6.25
Temperatura da água (°C)	26.4	26.2	26.5	26.7
Condutividade elétrica (µS.cm ⁻¹)	26	441	35	180
Oxigênio dissolvido ((mg.l ⁻¹))	7.75	7.12	7.70	8.04
Turbidez (NTU)	13	21	12	25
Março de 2005				
Altura do nível do Rio (m)*	3.84	3.84	3.84	3.84
pH	9.70	8.70	9.29	6.07
Temperatura da água (°C)	28.4	29.9	28.5	28.7
Condutividade elétrica (µS.cm ⁻¹)	30	74	32	32
Oxigênio dissolvido ((mg.l ⁻¹))	+4.24	+2.67	+3.84	+4.35
Turbidez (NTU)	17	22	16	14

* Dados fornecidos pela Marinha do Brasil: Agência Fluvial de Cáceres, MT – Brasil

Tabela II Resultados das análises químicas das amostras de água feitas no Rio Paraguai em agosto de 2004 e março de 2005

Parâmetros analisados	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3	Sítio 4
Coleta de água: “Seca” (Agosto/2004)				
Sulfetos (mg/L)	Nd	*13,6	*23,0	*92,9
Sólidos suspensos (mg/L) 105°C	52	152	184	148
Cromo (mg/L)	0,04	© 0,09	© 0,07	© 0,97
Coleta de água: “Cheia” (Março de 2005)				
Sulfetos (mg/L)	Nd	*8,0	*13,0	*68,2
Sólidos suspensos (mg/L) 105°C	36	88	92	76
Cromo (mg/L)	© 0,07	0,04	© 0,09	© 0,09
D.Q.O (mg/L)	8,0	81	85	44
D.B.O (mg/L)	5,0	46	47	25
Óleos e graxas (mg/L)	#0,10	#0,70	#1,80	#0,90
Sólidos sedimentados (mL/L)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Nd = não detectado

Tabela III – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 1), em Cáceres - MT.

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1	30	0,83	(25)	0,07	(02)	0,03	(01)	0,93	(28)	28
CPos 1	30	2,43	(73) +	0,20	(06) i	0,27	(08) +	2,90	(87) +	80
Set/2003	30	0,53	(16) -	0,07	(02) i	0,03	(01) i	0,63	(19) -	18
Abr/2004	30	0,73	(22) -	0,07	(02) i	0,00	(00) i	0,80	(24) -	23
CNeg 2	50	0,66	(33)	0,08	(04)	0,06	(03)	0,80	(40)	40
CPos 2	44	1,82	(80) +	0,18	(08) i	0,14	(06) i	2,14	(94) +	92
Ago/2004	40	0,80	(32) -	0,10	(04) i	0,05	(02) i	0,95	(38) -	37
Mar/2005	40	0,73	(29) -	0,20	(08) i	0,08	(03) i	1,00	(40) -	36

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela IV – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 2), em Cáceres - MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1	30	0,83	(25)	0,07	(02)	0,03	(01)	0,93	(28)	28
CPos 1	30	2,43	(73) +	0,20	(06) i	0,27	(08) +	2,90	(87) +	80
Set/2003	30	0,77	(23) -	0,10	(03) i	0,03	(01) i	0,90	(27) -	25
Abr/2004	30	0,73	(22) -	0,00	(00) i	0,07	(02) i	0,80	(24) -	24
CNeg 2	50	0,66	(33)	0,08	(04)	0,06	(03)	0,80	(40)	40
CPos 2	44	1,82	(80) +	0,18	(08) i	0,14	(06) i	2,14	(94) +	92
Ago/2004	47	0,85	(40) -	0,06	(03) i	0,00	(00) -	0,91	(43) -	42
Mar/2005	60	0,83	(50) -	0,05	(03) i	0,05	(03) i	0,93	(56) -	53

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela V – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 3), em Cáceres – MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1	30	0,83	(25)	0,07	(02)	0,03	(01)	0,93	(28)	28
CPos 1	30	2,43	(73) +	0,20	(06) i	0,27	(08) +	2,90	(87) +	80
Set/2003	60	0,60	(36) -	0,15	(09) i	0,05	(03) i	0,80	(48) -	46
Abr/2004	50	0,98	(49) -	0,08	(04) i	0,04	(02) i	1,10	(55) -	50
CNeg 2	50	0,66	(33)	0,08	(04)	0,06	(03)	0,80	(40)	40
CPos 2	44	1,82	(80) +	0,18	(08) i	0,14	(06) i	2,14	(94) +	92
Ago/2004	40	0,65	(26) -	0,13	(05) i	0,03	(01) i	0,80	(32) -	31
Mar/2005	60	1,27	(76) +	0,10	(06) i	0,07	(04) i	1,43	(86) +	82
<i>mwh/TM3</i>										
CNeg 1	20	0,40	(08)	0,00	(00)	d		0,40	(08)	8
CPos 1	20	1,05	(21) +	0,05	(01) i			1,10	(22) +	22
Mar/2005	40	0,58	(23) i	0,08	(03) i			0,65	(26) i	26

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela VI – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Standart (ST) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 4), em Cáceres – MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		M = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1.	30	0,83	(25)	0,07	(02)	0,03	(01)	0,93	(28)	28
CPos 1	30	2,43	(73) +	0,20	(06) i	0,27	(08) +	2,90	(87) +	80
Set/2003	30	0,73	(22) -	0,13	(04) i	0,07	(02) i	0,93	(28) -	27
Abr/2004	30	1,03	(31) i	0,07	(02) i	0,00	(00) i	1,10	(33) -	31
CNeg 2	50	0,66	(33)	0,08	(04)	0,06	(03)	0,80	(40)	40
CPos 2	44	1,82	(80) +	0,18	(08) i	0,14	(06) i	2,14	(94) +	92
Ago/2004	29	2,69	(78) +	0,21	(06) i	0,03	(01) i	2,93	(85) +	84
Mar/2005	50	0,72	(36) -	0,04	(02) i	0,10	(05) i	0,86	(43) -	43
<i>mwh/TM3</i>										
CNeg. 2	20	0,40	(08)	0,00	(00)	d		0,40	(08)	8
CPos 2	20	1,05	(21) +	0,10	(02) i			1,15	(23) +	23
Ago/2004	25	0,32	(08) i	0,16	(04) i			0,48	(12) i	12

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

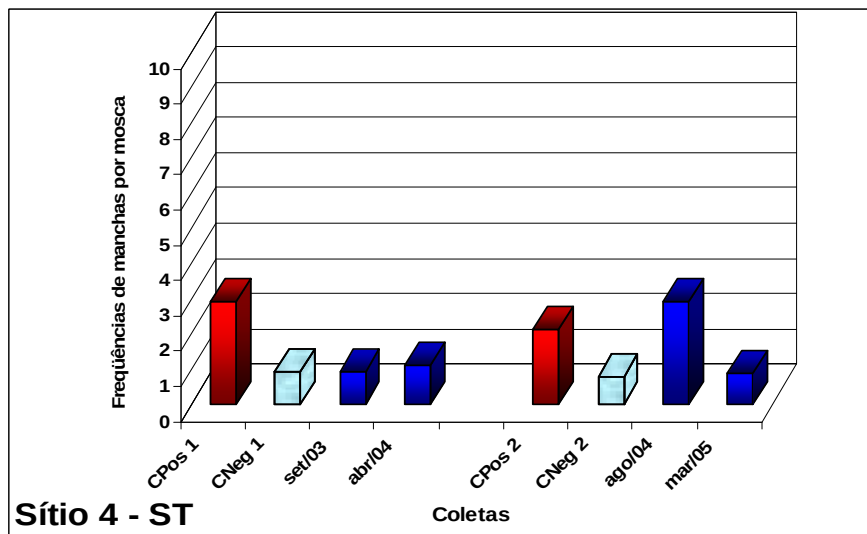
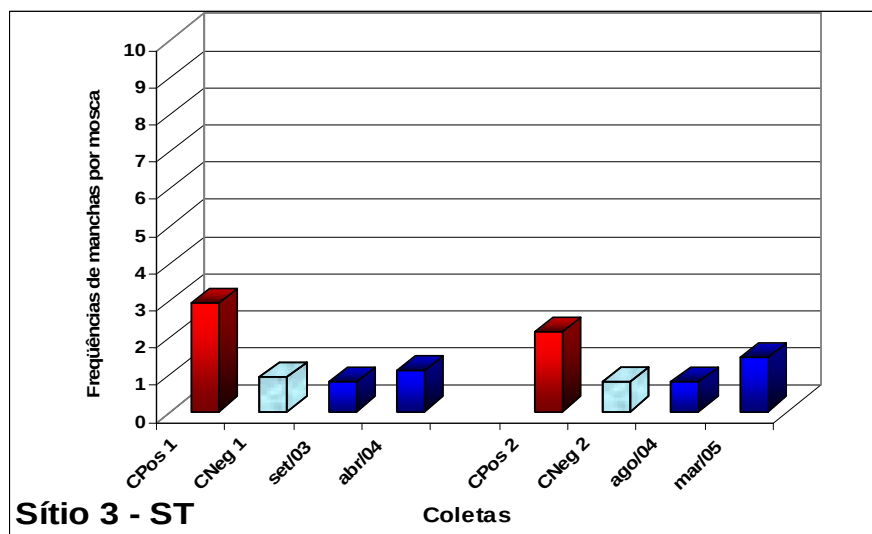
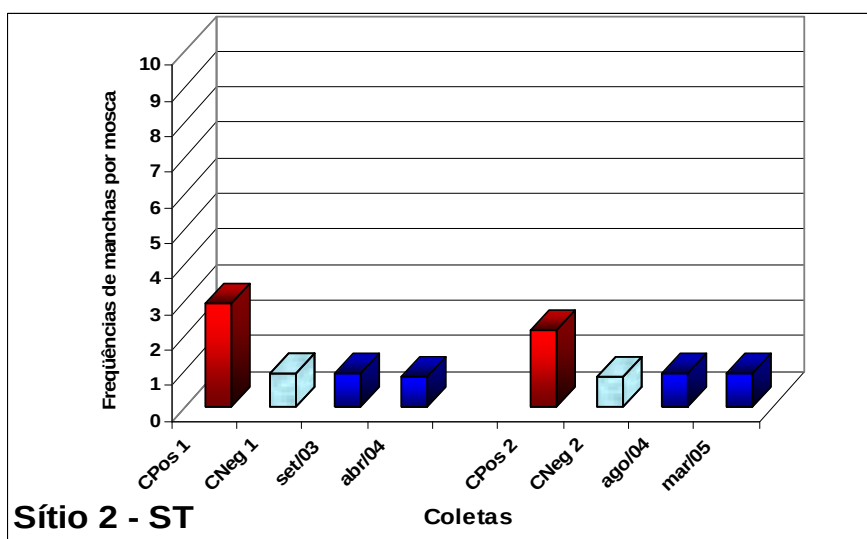
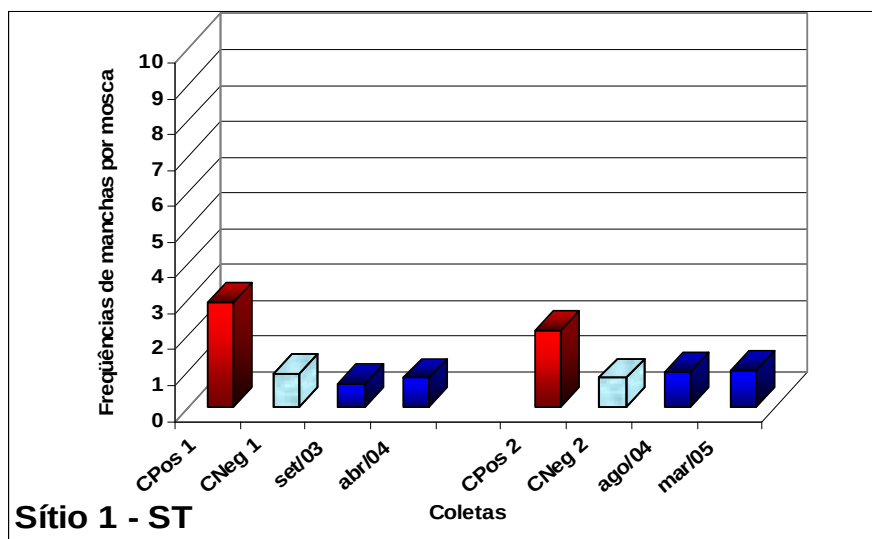


Figura 2 – Freqüências totais de manchas mutantes por mosca, observados em descendentes “MH” de *D. melanogaster*, proveniente do Cruzamento ST, tratados com águas de todas as coletas de todos os sítios estudados.

Tabela VII – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 1), em Cáceres – MT

Genótipos e Coletas (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³										
CNeg 1	30	1,40	(42)	0,17	(05)	0,07	(02)	1,63	(49)	51
CPos 1	30	12,80	(384) +	2,53	(76) +	2,47	(74) +	17,80	(534) +	486
Set/2003	30	1,80	(54) -	0,20	(06) i	0,13	(04) i	2,13	(64) -	62
Abr/2004	30	1,43	(43) -	0,13	(04) i	0,10	(03) i	1,67	(50) -	47
CNeg 2	50	1,86	(93)	0,08	(04)	0,02	(01)	1,96	(98)	98
CPos 2	50	7,68	(384) +	1,52	(76) +	0,70	(35) +	9,90	(495) +	480
Ago/2004	31	1,29	(40) -	0,10	(03) i	0,00	(00) i	1,39	(43) -	42
Mar/2005	40	1,65	(66) -	0,10	(04) i	0,05	(02) i	1,80	(72) -	68

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³.

Tabela VIII – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 2), em Cáceres – MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1	30	1,40	(42)	0,17	(05)	0,07	(02)	1,63	(49)	51
CPos 1	30	12,80	(384) +	2,53	(76) +	2,47	(74) +	17,80	(534) +	486
Set/2003	30	2,60	(78) +	0,27	(08) I	0,20	(06) i	3,07	(92) +	91
Abr/2004	30	1,60	(48) -	0,27	(08) I	0,03	(01) i	1,90	(57) -	56
CNeg 2	50	1,86	(93)	0,08	(04)	0,02	(01)	1,96	(98)	98
CPos 2	50	7,68	(384) +	1,52	(76) +	0,70	(35) +	9,90	(495) +	480
Ago/2004	40	4,10	(164) +	0,23	(09) I	0,15	(06) +	4,48	(179) +	164
Mar/2005	40	3,33	(133) -	0,23	(09) I	0,05	(02) i	3,60	(144) -	129
<i>mwh/TM3</i>										
CNeg. 1	20	0,55	(11)	0,05	(01)	d		0,60	(12)	12
CPos 1	20	7,05	(141) +	0,30	(06) I			7,35	(147) +	147
Set/2003	20	1,10	(22) +	0,05	(01) I			1,15	(23) +	23
CNeg 2	20	0,65	(13)	0,05	(01)	d		0,70	(14)	14
CPos 2	20	4,95	(99) +	0,25	(05) I			5,20	(104) +	104
Ago/2004	40	0,83	(33) i	0,08	(03) I			0,90	(36) i	36

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela IX – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) e Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 3), em Cáceres - MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total Manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1	30	1,40	(42)	0,17	(05)	0,07	(02)	1,63	(49)	51
CPos 1	30	12,80	(384) +	2,53	(76) +	2,47	(74) +	17,80	(534) +	486
Set/2003	30	3,23	(97) +	0,47	(14) +	0,13	(04) i	3,83	(115) +	102
Abr/2004	30	2,50	(75) +	0,27	(08) i	0,13	(04) i	2,90	(87) +	81
CNeg 2	50	1,86	(93)	0,08	(04)	0,02	(01)	1,96	(98)	98
CPos 2	50	7,68	(384) +	1,52	(76) +	0,70	(35) +	9,90	(495) +	480
Ago/2004	35	1,71	(60) -	0,20	(07) i	0,06	(02) i	1,97	(69) -	72
Mar/2005	40	2,68	(107) -	0,15	(06) i	0,03	(01) i	2,85	(114) -	108
<i>mwh/TM3</i>										
CNeg. 1	20	0,55	(11)	0,05	(01)	d		0,60	(12)	12
CPos 1	20	7,05	(141) +	0,30	(06) i			7,35	(147) +	147
Set/2003	20	0,45	(09) -	0,00	(00) i			0,45	(09) -	9
Abr/2004	40	1,08	(43) +	0,05	(02) i			1,13	(45) +	45

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela X – Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Trans-heterozigotos marcados (MH) do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 4), em Cáceres - MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)
		MSP		MSG		MG		TM		
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b						
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2		
<i>mwh/flr³</i>										
CNeg 1.	30	1,40	(42)	0,17	(05)	0,07	(02)	1,63	(49)	51
CPos 1	30	12,80	(384) +	2,53	(76) +	2,47	(74) +	17,80	(534) +	486
Set/2003	30	2,60	(78) +	0,47	(14) +	0,20	(06) i	3,27	(98) +	93
Abr/2004	30	2,73	(82) +	0,17	(05) i	0,07	(02) i	2,97	(89) +	74
CNeg 2	50	1,86	(93)	0,08	(04)	0,02	(01)	1,96	(98)	98
CPos 2	50	7,68	(384) +	1,52	(76) +	0,70	(35) +	9,90	(495) +	480
Ago/2004	31	3,03	(94) +	0,32	(10) +	0,10	(03) i	3,45	(107) +	103
Mar/2005	49	3,57	(175) +	0,08	(04) i	0,06	(03) i	3,71	(182) +	181

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela XI– Sumário dos resultados obtidos em Teste mancha de asas em *Drosophila melanogaster* (SMART) em descendentes Heterozigotos balanceados (BH) do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) após tratamento de larvas com amostras de águas superficiais do Rio Paraguai (Sítio 4), em Cáceres - MT

Genótipos e Coletas	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total MG	manchas mwh ^c (n)		
		MSP		MSG				TM	
		(1-2 céls) ^b		(>2 céls) ^b					
		m = 2		m = 5					
<i>mwh/TM3</i>									
CNeg 1	20	0,55	(11)	0,05	(01)	d	0,60	(12)	12
CPos 1	20	7,05	(141) +	0,30	(06) i		7,35	(147) +	147
Set/2003	40	0,58	(23) i	0,05	(02) i		0,63	(25) i	25
Abr/2004	40	0,75	(30) i	0,05	(02) i		0,80	(32) i	32
CNeg 2	20	0,65	(13)	0,05	(01)	d	0,70	(14)	14
CPos 2	20	4,95	(99) +	0,25	(05) i		5,20	(104) +	104
Ago/2004	40	0,70	(28) i	0,00	(00) i		0,70	(28) -	28
Mar/2004	40	0,68	(027) -	0,05	(02) i		0,73	(29) -	29

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³.

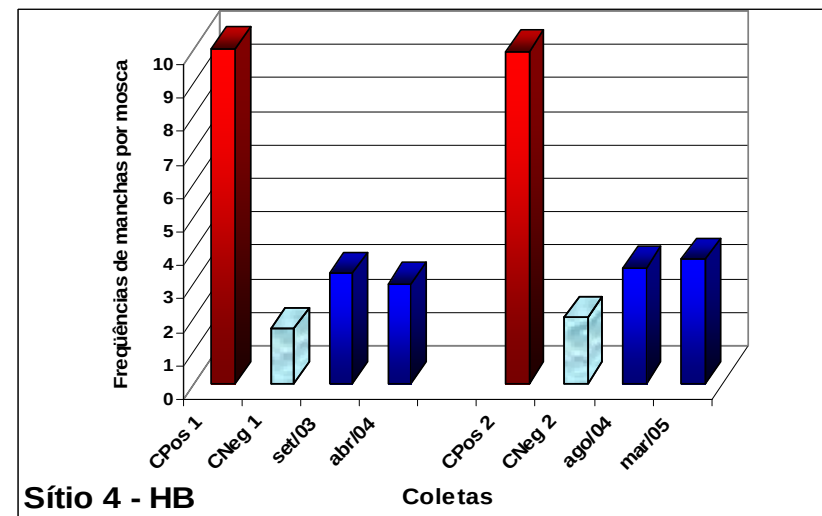
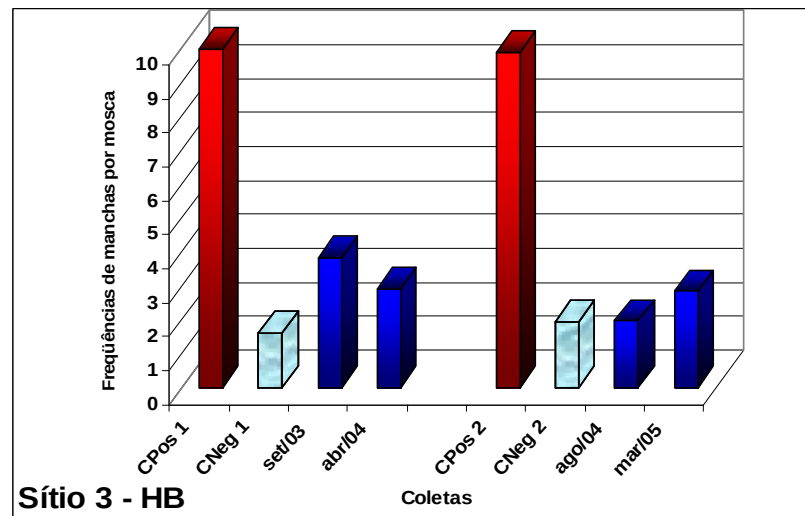
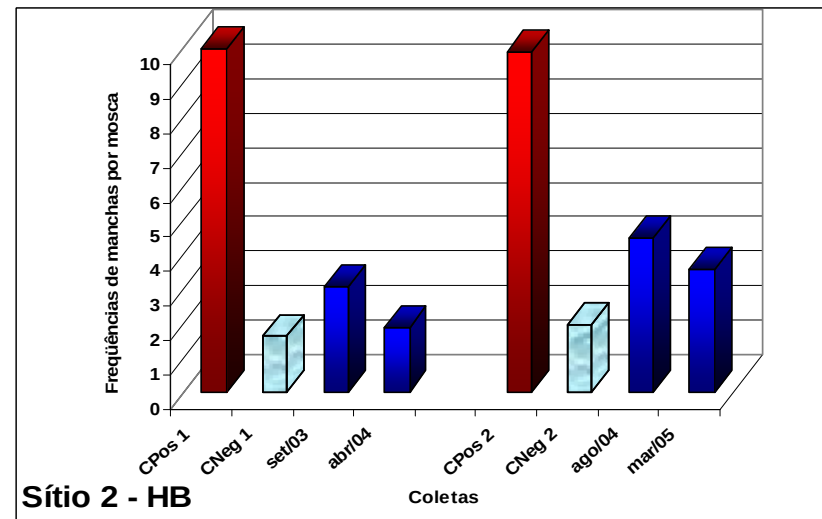
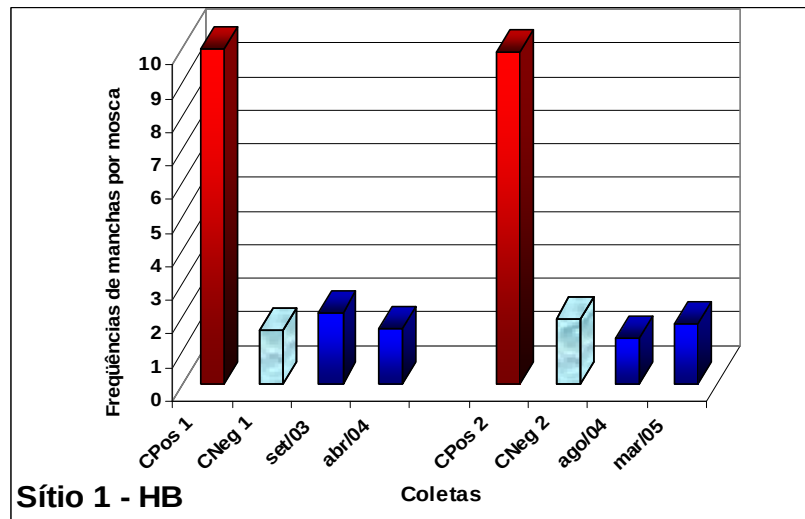


Figura 3– Frequências totais de manchas mutantes por mosca, observados em descendentes “MH” de *D. melanogaster*, proveniente do Cruzamento HB, tratados com águas de todas as coletas de todos os sítios estudados

CAPÍTULO 3 – MANUSCRITO:
AVALIAÇÃO *IN SITU* DAS ÁGUAS DO RIO PARAGUAI EM
CÁCERES (MT) PELO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES E
ANÁLISES QUÍMICAS

**AVALIAÇÃO *IN SITU* DAS ÁGUAS DO RIO PARAGUAI, CÁCERES – MT,
BRASIL, PELO TESTE DE MICRONÚCLEOS EM PEIXES E ANÁLISES
QUÍMICAS**

**Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta^{1,2}, Júlio César Nepomuceno², Luiz Alfredo
Pavanin³**

**¹UNEMAT - Universidade do Estado de Mato Grosso, Instituto de Ciências
Naturais e Tecnológicas, *Campus* Cáceres – MT, Brasil**

**²UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e
Bioquímica, Campus Umuarama, Uberlândia – MG, Brasil**

**³UFU – Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Campus
Santa Mônica, Uberlândia – MG, Brasil**

**Correspondence to: Júlio César Nepomuceno, Universidade Federal de
Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese.
Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brasil.
E-mail: nepomuceno@ufu.br Phone: +55 (34) 32182505; Fax: +55 (34)
32182203.**

RESUMO

Para avaliar a qualidade da água do Rio Paraguai no trecho da cidade de Cáceres, localizada a margem esquerda do Rio, a 210 Km da capital Cuiabá, no Estado de Mato Grosso (Brasil), foi utilizado o Teste de Micronúcleos em Peixes (TMNP) e análises químicas. O Rio Paraguai é o principal tributário da Bacia do Alto Paraguai, nasce no interior do Estado de Mato Grosso (Brasil), na região do Planalto dos Parecis, segue em direção ao sudoeste, cujas águas fluem ao Pantanal. No trecho estudado, as águas do Rio sofrem diretamente ou indiretamente várias ações antropogênicas. Foram coletados sangues periféricos dos peixes em abril e agosto de 2004, portanto, em período de cheia e seca, respectivamente, nos sítios onde são jogados: 1)- a montante ao perímetro urbano, usado como referência. 2) Córrego Sangradouro (perímetro urbano, efluentes sanitários) 3)- efluentes de curtume (grande porte). O Sítios 3 situa-se a jusante ao perímetro urbano. Foram coletados *Pimelodus maculatus* nos sítios 1, 2 e 3 nos períodos de cheia e seca; e *Leporinus friderici* nos pontos 1 e 3, apenas no período de seca. Foram analisados nas águas e sedimentos do rio: sulfetos, sólidos suspensos, cromo (Cr), óleos e graxas, demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio, sólidos sedimentados. Os resultados mostram que em todos os sítios foram encontrados Cr; e sulfetos nos Sítios 2 e 3, e óleos e graxas também nos três sítios, cujos valores estão acima do permitido pela legislação brasileira vigente. Os dados demonstraram aumentos estatisticamente significativos nas freqüências de micronúcleos (MN) nas células vermelhas do *Pimelodus maculatus* nos Sítio: 2 e 3, quando comparados com os do sítio 1; e também demonstraram aumentos, estatisticamente significativos, nas freqüências de MN nas células vermelhas do *Leporinus friderici* do sítio 3, quanto comparados com os do sítio 1. Portanto, os resultados constataram aumentos significativos tanto no período de cheia quanto de seca, demonstrando assim, que as águas do Rio Paraguai, no trecho de Cáceres, estão recebendo efluentes genotóxicos, os quais podem estar associados à presença de metais pesados (Cr), sulfetos, óleos e graxas e/ou outras substâncias químicas.

Palavras-chave: Cromo; sulfeto; Rio Paraguai; Ambiente Aquático.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e urbanização acentuada ao longo de margens de rios e beira-mar têm introduzido na água, grandes quantidades de diversas substâncias biologicamente ativas, inclusive milhares de compostos químicos orgânicos e inorgânicos - xenobióticos (Bresler et al., 1999). Assim, poluição tem sido a maior preocupação em áreas urbanas. Devido ao seu significado biológico, a genotoxicidade destas substâncias demonstra ser o foco principal da avaliação de poluição, principalmente devido a crescente complexidade do ambiente químico em que os organismos estão expostos (Prá et al., 2005).

A origem da atividade ecotoxicológica no ambiente está relacionada à descarga industrial, à doméstica, à contaminação por produtos agrícolas ou ainda a produtos naturais potencialmente reativos (Vargas et al., 2001). Ecossistemas aquáticos inclusive córregos, rios, lagos, e estuários têm sido alvo de crescentes ações antropogênicas. Organismos aquáticos recebem ações de variados e numerosos estressores induzidos naturalmente e pelo homem, que agem espacialmente e temporalmente (Adams e Greeley, 2000).

Desta forma, o ambiente aquático tem sido um depósito de tipos diferentes de descargas antropogênicas, principal ação para o aumento da contaminação xenobiótica, produzidas por misturas complexas e desconhecidas (Lemos e Erdtmann, 2000). Os cursos de águas têm sido freqüentemente usados para transportar produtos residuais para longe do local de produção e descarga. Infelizmente, os produtos residuais transportados são freqüentemente tóxicos, e a presença deles pode degradar seriamente o hábitat de rios, lagos, portos ou córregos (White e Rasmussen, 1998). Contaminantes ambientais pode afetar sistemas genéticos a uma variedade de níveis de organização biológica (Bickham et al., 2000). Estresses xenobióticos de ecossistemas naturais causam doenças nas biotas selecionadas, aumentando a letalidade que freqüentemente conduz a extinção do organismo mais sensível e o domínio de mais resistente e organismos oportunistas (Bresler et al., 1999).

Muitas espécies animais podem ser usadas como bioindicadores, para testar os efeitos de algumas substâncias químicas em linhagens de laboratório, ou para avaliar populações naturais na investigação da presença de poluição no

ecossistema (Cristaldi et al., 2004). O peixe é um modelo adequado e muito utilizado como bioindicador de genotóxicos no meio aquático (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996, Grisolia e Starling, 2001), devido sua habilidade para metabolizar xenobiótico e acumular contaminantes (Grisolia e Cordeiro, 2000). Amostras de sangue periférico são apropriadas e suficientes para projetos de biomonitoramentos, pois permitem coleccionar várias amostras do mesmo indivíduo, sem ter que sacrificar o animal (Nepomuceno et al., 1997, Palhares e Grisolia, 2002).

Dentre as técnicas para detectar efeitos genéticos e genotóxicos em peixe, o Teste de Micronúcleos em Peixes (TMNP) é freqüentemente usado, visto que é relativamente fácil para adaptar às espécies (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005a). O TMNP é uma potente ferramenta no biomonitoramento *in situ* para detectar agentes genotóxicos em vários estudos, é aplicável em peixe de água doce e salgada (Hayashi et al., 1998), assim, é extremamente usado para monitorar compostos genotóxicos em ecossistemas de água doce e salgada (Grisolia et al., 2005). Além de micronúcleos (MN), células binucleadas e anormalidades nucleares geralmente sejam indicadores de genotoxicidade em peixe e podem complementar a contagem de MN em pesquisas de genotoxicidade (Ayllón et al., 2000; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005a).

A cidade turística de Cáceres, localizada à margem esquerda do Rio Paraguai, ao sudoeste do Estado de Mato Grosso (Brasil), como todas as cidades beira-rio, apresenta desequilíbrios ambientais, devido às conseqüências de ações antropogênicas como o lançamento de efluentes dos esgotos sanitários e agro-industriais (efluentes de frigorífico, curtume, laticínio), turismo, impactos provocados pela hidrovía Paraguai-Paraná, e o Festival Internacional de Pesca (FIP), maior campeonato de pesca de água doce do mundo, realizado anualmente, que tem afetado a qualidade das águas do rio temporalmente e espacialmente. De acordo com Iocca (2000), crescimento desordenado da região urbana e no entorno, motivado pela expansão das atividades agropecuárias e expansão urbana, tem provocado impactos ambientais com reflexos diretos na qualidade de vida da população.

O Rio Paraguai é o principal tributário da Bacia do Alto Paraguai (Assine e Soares, 2004). Suas águas fluem ao longo do lado ocidental do Pantanal,

coleccionando água de vários tributários, como também de contribuições difusas da planície inundável (Hamilton et al., 1997). O Rio Paraguai nasce na região do Planalto dos Parecis, o grande divisor de águas entre a bacia Amazônica e Platina, no Estado de Mato Grosso, drenando as regiões de depressão e planície do pantanal mato-grossense, em direção ao Paraguai e Argentina. Nesse percurso, o rio Paraguai drena diversos ambientes e formações vegetais variadas, desenvolvendo-se em uma região com grande riqueza e diversidade de espécies vegetais e animais. A bacia do Alto Paraguai reveste-se de grande importância no contexto estratégico da administração dos recursos hídricos do Brasil, da Bolívia e do Paraguai, que a compartilham. A Bacia inclui o Pantanal, uma das maiores extensões de áreas alagadas do planeta, com 147.574 km², e é o elo de ligação entre o Cerrado do Brasil e o Chaco da Bolívia e do Paraguai (FEMA, 2003).

Diante disto, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade das águas do Rio Paraguai, em período de cheia e seca, no trecho de Cáceres, pelo TMNP empregado nas espécies *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici*, bem como, análises químicas de águas e sedimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas:

Sítios selecionados e períodos de coletas

Cáceres é uma cidade localizada no Estado de Mato Grosso, a 210 Km da Capital Cuiabá, à margem esquerda do Rio Paraguai, coordenadas 16°11'42" latitude sul e 57°40'51' longitude oeste (www.caceres.mt.gov.br).

As coletas foram realizadas em abril e agosto de 2004, sendo período de cheia e seca, respectivamente. Assim os locais escolhidos foram baseados nos níveis aparentes de poluição mais críticos (Çavas e Ergene-Gözükkara, 2005b). Os escolhidos foram os de liberação de efluentes de: 1) - a montante ao perímetro urbano, usado como referência, situa-se a 1.200 metros a montante do sítio dois; 2) - Córrego Sangradouro, que deságua na Baía do Malheiros (Rio Paraguai), perímetro urbano, efluentes sanitários de diferentes fontes; cuja coordenada geográfica de localização é S 16°03' 40,9" W 57° 41' 19,7"; 3) - curtiúme de grande

porte; situa a 11.500 metros a jusante do sítio dois. A Figura 1 mostra a localização dos sítios de coletas em relação à cidade de Cáceres – MT.

Dados físico-químicos obtidos *in loco*, em cada coleta.

Foram coletados os dados de altura do nível águas do Rio, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutibilidade elétrica e turbidez das duas coletas, em todos os sítios selecionados.

Espécimes: escolha, coletas, preparação das lâminas e análises.

Foram escolhidas as espécies: 1) *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae), conhecida como mandi ou bagre, por apresentar ampla distribuição geográfica, sendo restrita aos sistemas fluviais da América do Sul e alimentação onívora. Nesta espécie, foram verificados os efeitos de alguns íons de metal no sangue e fígado de *Pimelodus maculatus* (Rodrigues et al., 1989). *P. maculatus* foi empregado como bioindicador da qualidade da água e tanto para as enzimas do estresse oxidativo como a atividade da Na⁺K⁺ATPase branquial, sangue série branca e vermelha, histopatologia, etc; essa espécie tem respondido as alterações na qualidade da água (Sakuragui et al., 2007). 2) *Leporinus friderici* (Anostomidae), conhecida como piauí, também restrita a América do Sul, amplamente distribuída pela região, apresenta plasticidade alimentar. Esta espécie demonstrou ser bom bioindicador de bioacumulação de mercúrio provenientes de ações antropogênicas (Dorea et al., 2006).

As duas espécies foram coletadas simultaneamente. Foram coletados 25 exemplares *Pimelodus maculatus* no período de cheia do rio; 31 no período de seca nos três sítios de estudo. O tamanho destes animais variou entre 20 ± 5 cm. Foram também coletados 15 exemplares de *Leporinus Friderici* no período de seca em dois sítios. O Tamanho destes variou entre 26 ± 5 cm. No total foram analisadas 288.000 células vermelhas do sangue em 71 animais, conforme Tabela III.

Para padronizar as condições das amostras nas características físico-químicas *in loco*, as coletas de amostras de águas e sedimentos, para análises químicas, e de peixes, foram realizadas em apenas um dia na cheia e outro na

seca. Devido a isto, teve-se dificuldade na obtenção dos espécimes estudados em todos os sítios, o que proporcionou uma amostragem reduzida.

Peixes foram capturados em até um raio de 20 metros do marco de cada sítio, por meio do modo tradicional de pesca com isca e anzol. Após, foi retirado sangue periférico na artéria branquial, conforme descrevem Nepomuceno et al. (1997), por meio de seringa estéreis (para insulina), sendo uma para cada animal, previamente heparinizada com liquemine (heparina sódica - 25000 U.I./ 5 mL, Roche – Basileia - Suíça). Imediatamente foram realizados os esfregaços, que foram secas ao ar por 24 horas (Grisolia e Starling, 2001). A seguir, as células foram fixadas com metanol absoluto, por dez minutos. As lâminas foram submetidas ao processo de coloração com Giemsa e tampão fosfato (pH - 6,8) na proporção de 1:20, durante 10 minutos, e, após, enxaguadas com água destilada e secadas ao ar. Foram preparadas 4 lâminas para cada animal. Foram analisados 4.000 células vermelhas do sangue por animal em microscópio de luz (aumento de X 1000 magnificação), analisadas, conforme Schmid (1975). Escolheu-se registrar somente micronúcleos (MN) formados e células binucleadas (CB). As células binucleadas foram as que tinham dois núcleos de mesmo tamanho e coloração (como propõe Ayllón et al., 2000; Çavas e Ergene-Gözükara, 2005a). Os critérios para identificação das células vermelhas do sangue de peixe micronucleados: partículas nucleares que deveriam ser menores e do mesmo tamanho, completamente separadas do núcleo principal; não-refratária; com mesma forma, coloração e intensidade do núcleo da célula e, dentro do citoplasma celular. As frequências das células micronucleadas e binucleadas (que foram poucas) foram computadas em conjunto.

Análises químicas

Foram coletados águas e sedimentos dos sítios de estudo. A seguir, as amostras de água foram acidificadas e resfriadas; e as de sedimentos foram congeladas. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química/IQ/UFG, Minas Gerais, Brasil.

Análise estatística

As frequências de micronúcleos expressas nas células vermelhas do sangue dos peixes *P. maculatus* e *L. friderici* dos Sítios 2 e 3 foram comparadas com as dos Sítio 1 (referência) pelo Teste *U* de Mann-Whitney , teste não paramétrico, com níveis de significância de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Das características físico-químicas coletadas *in loco*, houve variação em todos os parâmetros de um sítio para outro no mesmo período de coleta, sendo que cada um teve sua identidade específica, exceto a temperatura que teve uma variação mínima de um sítio para outro. De um período de coleta a outro, em todos os sítios, houve variação quanto à altura do nível do rio, pH, temperatura, condutividade elétrica e turbidez. Os valores do oxigênio dissolvido, só não variaram entre os sítios no período de cheia, onde os valores dos sítios foram bem próximos, conforme Tabela I.

Os resultados das análises químicas das águas e sedimentos de cada sítio estão demonstrados na Tabela II. Verifica-se a detecção de cromo (Cr) em águas e sedimentos de todos os Sítios, inclusive no Sítio 1 (referência), exceto na amostra de sedimento da coleta na cheia que apresentou Cr somente no Sítio 3. Foi detectado também sulfetos nas águas dos Sítios 2 e 3, em todas amostras de sedimentos do Sítio 3. além de óleos e graxas nos sedimentos de todos os sítios, excetos na coleta de cheia do sítio 3.

Os resultados do TMNP estão demonstrados na Tabela III. Verifica-se que as frequências de MN em células vermelhas de *P. maculatus* foram aumentadas significativamente nos Sítios 2 e 3, quando comparadas com o sítio 1, tanto na coleta na cheia quanto na seca ($P < 0.01$). Houve também aumentos, estatisticamente significativos, na indução de MN do *L. friderici* coletados no Sítio 3, quando comparado com os indivíduos coletados no sítio 1 ($P < 0.01$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pela legislação brasileira (CONAMA, 2005), para águas de rio de classe 2, como é o caso do Rio Paraguai, é permitido valores de oxigênio dissolvido ≥ 5

mg/L; $\leq 0,002$ mg/L de sulfeto (S); $\leq 0,05$ mg/L de cromo (Cr) e óleos e graxas virtualmente ausentes.

Foram verificadas diferenças significativas quanto às características físico-químicas (Tabela I) *in loco* e análises químicas (Tabela II), entre os períodos de cheia e secas. Ecossistemas sujeitos a altos níveis de poluição são geralmente expostos a outros danos antrópicos tais como: flutuações do fluxo de água, oscilações térmicas, níveis altos de suspensos em água, baixa oxigenação, etc. (Sánchez-Galán et al., 1998). Os valores contidos na tabela I obedecem à legislação, exceto o ⁺oxigênio dissolvido, cujos valores estão abaixo, especialmente no período de cheia (abril). Quanto aos valores contidos na tabela II tanto no sedimento quanto na água de: * sulfetos; © cromo e #óleos e graxas estão fora do permitido pela legislação brasileira. Desta forma, os efluentes recebidos pelas águas do rio Paraguai estão alterando a qualidade daquele ambiente aquático.

Em geral, as freqüências de micronúcleos em peixes são mais altas nas estações mais quentes, especialmente no verão (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005b). Assim é possível também, que o aumento da freqüência de micronúcleos demonstrada no presente estudo seja devido a diferenças sazonais (cheia e seca), como propõe Hayashi et al. (1998) e Çavas e Ergene-Gözükara (2005b). Um dos fatores sazonais mais importantes que pode afetar as freqüências de MN é a temperatura da água. Porque peixes são animais pecilotérmicos e o metabolismo deles é altamente dependente da temperatura ambiental. No estudo presente, ao comparar as freqüências de MN induzidos no *P. maculatus* coletados nos sítios 1, 2 e 3 no período de cheia (outono) e de seca (inverno), verifica-se diferenças sazonais (Tabela III). Os valores das freqüências são, estatisticamente, mais altos no período de seca, provavelmente porque os poluentes estão mais concentrados, além de outros fatores, assim como relatados no estudo de Çavas e Ergene-Gözükara (2005b).

A toxicidade do Cr depende do estado de oxidação em que é lançado no efluente. As formas Cr (III) e Cr (VI) são comumente encontradas no ambiente, e a oxidação de Cr (III) em Cr (VI) e vice-versa pode ocorrer naturalmente no meio aquoso, mas a forma hexavalente, geralmente é em menor concentração. Cr (II) é bastante instável e rapidamente é oxidado para Cr (III), enquanto que o Cr

elementar (O) também é oxidado a Cr (III). Nos efluentes de curtumes predominam os compostos de Cr (III), que dependendo de alguns parâmetros característicos do corpo d'água receptor, acredita-se que a oxidação de Cr (III) à Cr (VI) possa ser favorecida (Seigneur e Constantinou, 1995). Assim, deve-se considerar a possibilidade de descargas com íons Cr (III), mesmo não sendo tão nocivos, induzirem efeitos tóxicos, quando em elevadas concentrações.

O aumento do nível de indução de MN em eritrócitos por Cr (III), é determinado pela concentração da dose e o tempo de exposição (Al-Sabti et al., 1994). De acordo com Çavas e Ergene-Gözükara (2005b), absorção lenta de Cr (III) encontrada em efluente b tem causado aumentos significativos, nas alterações genéticas, apenas em altas concentrações e com longa duração de exposição. Em contraste, nos estudos de Graf et al. (1992), o cloreto de Cr (III) não demonstrou genotoxicidade em asas de *Drosophila melanogaster* pelo SMART. Provavelmente esta contradição foi devida ao SMART ser um teste de curta duração, ou seja, o período de exposição foi curto. Sendo assim, é possível que o Cr encontrado no Sítio 4, em nossa avaliação química, seja o Cr (III), pois, em estudos realizados pelos mesmos autores desta pesquisa (dados ainda não publicados), foi constatado que o Cr, encontrado nas águas do Sítio 1, não induziu genotoxicidade em asas de *Drosophila melanogaster* pelo Teste SMART, assim como ocorreu nos estudos de Graf et al. (1992).

No entanto, os efeitos genotóxicos do Cr (VI) e (III) foram verificados em eritrócitos de *Carassius auratus gibelio*, pelo teste de micronúcleos (Al-Sabti et al., 1994). O Cr tem o potencial para induzir quebra cromossômica (efeito clastogênico) e perdas cromossômicas (efeitos aneugênicos), resultando em aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e células binucleadas (Matsumoto et al., 2006). O Cr (VI) é altamente tóxico em hepatócitos de peixe-vermelho (Krumnschnabel e Nawaz, 2004), é carcinógeno em peixes (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005b), e potente carcinógeno em células de pulmão humano (Wise et al., 2004), Cr (VI) é citotóxico e genotóxico para células epiteliais de pulmões humanos (Wise et al., 2006). Graf et al. (1992) demonstraram que o óxido de Cr (VI) foi altamente genotóxico em tratamentos crônicos e agudos em teste SMART de asas de *Drosophila melanogaster*, e que mais de 90% das manchas induzidas foram devidas a eventos recombinogênicos mitóticos.

Foi detectado sulfetos nos Sítios 2 e 3. Dióxido de enxofre (SO_2) e seus hidrato bissulfito (HSO_3^-) e sulfito (SO_3^{2-}) demonstraram genotoxicidade em linfócitos humanos e outros mamíferos. O bissulfito é um agente genotóxico em moléculas de DNA, em células de animais e de planta (Yi e Meng, 2003). Derivados de dióxido de enxofre (SO_2), como mistura de sulfito de sódio e bisulfito, induziram atividade genotóxica em ratos, com ação tóxica sistêmica (Meng et al., 2004). O metabissulfito de sódio (SMB) induziu aberrações cromossômicas (quebra de cromátides e de cromossomos), e troca de cromátides irmãs em todas as concentrações estudadas, com dose dependente, em linfócitos humanos (Rencüzogullari et al., 2001).

Veículos com motores a diesel e a gasolina são também fontes de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Oros e Ross, 2004; Shama et al., 2007). A toxicidade petroquímica crônica é associada com frações de gasolina (WSF) solúvel em água (Paixão et al., in press), que geralmente é atribuída a presença de PAHs mono-aromáticos (Durako et al., 1993; Masten et al., 1994; Baird, 2002; Paixão et al., in press). Nitrocompostos contribuem para a atividade mutagênica de PAHs (Vargas et al., 1998). O PAHs representa uma classe de promutágenos (Frölich e Würigler, 1990; Missini et al., 1998), pode aumentar a taxa proliferativa e a probabilidade de fixação de mutações (Andrysík et al., 2007), potente carcinogênico em várias espécies animais, inclusive para células humanas (Boland et al., 1998; Delgado-Rodriguez et al., 1995; Kuljukka-Rabb et al., 2001; Zhao et al., 2003). Assim, para a genotoxicidade apresentada no presente estudo, deve-se considerar também a ação de óleos e graxas citadas na tabela 2.

Desta forma, a genotoxicidade detectada no presente estudo, pode ter sido induzida pelo Cr e/ou sulfetos detectados e/ou óleos e graxas (conforme Tabela II), ou ainda, por outros componentes não analisados nas águas do rio. Pois, águas fluviais são misturas complexas (Minissi et al., 1996) e efluentes industriais e água de superfície também são misturas complexas (Reifferscheid e Grummt, 2000; Lima et al., 2007), que são compostas por milhares de componentes individuais, que podem interagir de forma aditiva, sinérgica ou antagônica (Lemos e Erdtmann, 2000; Vargas et al., 2001; Fent, 2003; Horn et al., 2004). Mas Falta a compreensão da interação dos toxicantes entre si, e deles com os outros

componentes dos efluentes (White, 2002; Fent, 2003; Hewitt e Marvin, 2005). Assim, a previsão de toxicidade através das análises químicas de substâncias isoladas pode fornecer dados pouco precisos quanto ao efeito genotóxico de misturas complexas, sobre os organismos vivos (Vargas et al., 2001). Também, é muito difícil identificar substâncias químicas específicas como uma resposta genotóxica em amostras ambientais, porque poucos componentes presentes estão em concentrações altas (Stahl, 1991). Assim sendo, a causa de dano genético não pode ser atribuída a um único agente específico devido à constituição da mistura complexa (Donbak et al., 2005).

Diferentes espécies de peixe podem responder de modos completamente diferentes a um determinado agente genotóxico. Dependendo do agente tóxico e das espécies, os comportamentos de taxas de micronúcleos podem exibir variações significantes, provavelmente relacionados à farmacocinética das drogas usadas e a velocidade do ciclo hematopoiético (Palhares e Grisolia, 2002). Existe sensibilidade diferencial em peixe, quanto à indução de micronúcleos, algumas espécies de peixe podem servir como mais sensíveis sentinelas que outros na avaliação de contaminantes genotóxicos (Pantaleão et al., 2006). Desta maneira, ao comparar as taxas de MN induzidas nas células vermelhas do sangue de *P. maculatus* no Sítio 1 e 3 no período de seca com as das células vermelhas do sangue de *L. friderici*, do mesmo período, verifica-se maior taxa, o que provou que a espécie *P. maculatus* foi mais sensível (Tabela III).

A avaliação das águas do Rio Paraguai no trecho de Cáceres realizada neste estudo está fundamentada na aplicação do TMNP, associada à análises químicas para alguns parâmetros, selecionadas pelos possíveis tipos de efluentes. Devido os Sítios 1 e 2 ser a montante do sítio 3 (curtume), ou seja, acima da principal fonte de poluição de água por Cr, sugere-se que outros estudos sejam realizados para descobrir as fontes de Cr, sulfetos, bem como óleos e graxas encontrados, tendo em vista que de acordo com Buss et al. (2003), efluentes mesmo estando dentro das normas legais, podem degradar as inter-relações biológicas

Conclui-se que o TMNP foi efetivo na avaliação *in situ* das águas do Rio Paraguai, no trecho de Cáceres. As espécies *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici* demonstraram ser bons bioindicadores de genotoxicidade, sendo o *P.*

maculatus mais sensível, e que estas águas estão recebendo efluentes genotóxicos, sendo o Sítio 3, o mais crítico, seguido do Sítio 2.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT/ICNT/*Campus* Cáceres) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro; Universidade Federal de Uberlândia pelo acolhimento do projeto. Ao Dr. Francisco Langeani, Departamento de Zoologia e Botânica da UNESP - *Campus* de São José do Rio Preto, pela identificação da espécie *Leporinus friderici* (Bloch, 1794).

REFERÊNCIAS

Adams SM, Greeley MS. 2000. Exotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *J. of Water, Air, and Soil Pollution* 123: 103-115.

Al-Sabti K, Franko M, Andrijanic B, Knez S, Stegnar P. 1994. Chromium-induced micronuclei in fish. *Journal of applied toxicology* 14: 333-336.

Al-Sabti K, Metcalfe CD. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343: 121–135.

Andrysík Z, Vondráček J, Machala M, Krčmář P, Švihálková-Šindlerová L, Kranz A, Weiss C, Faust D, Kozubík A, Dietrich C (2007) The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells. *Mutation Research* 615(1-2): 87-97.

Ayllón F, Suciú R, Gephart S, Juanes F, García-Vázquez E. 2000. Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*. *Mutation Research* 470: 169–176.

Assine ML, Soares PC. 2004. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International* 114: 23–34.

Baird C. 2002. *Química Ambiental*/Colin Baird; trad. Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera, second ed. Bookman, Porto Alegre.

Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L, Athwal R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463: 33-51.

Boland S, Baeza A, Fournier T, Aubier M, Marano F. 1998. Effects of diesel exhaust particles on human airway epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters* 95(Supplement 1): 224-225.

Bresler V, Bissinger V, Abelson A, Dizer H, Sturm A, Kratke R, Fishelson L, Hansen PD. 1999. *Marine molluscs* and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research* 53: 219–243.

Buss DF, Baptista DF; Nessimian JL. 2003. Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water quality programs. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(2): 465-473.

Çavas T, Ergene-Gözükara S, 2005a. Micronucleus Test in Fish Cells: A Bioassay for In Situ Monitoring of Genotoxic Pollution in the Marine Environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 46: 64-70.

Çavas T, Ergene-Gözükara S. 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74(3): 264–271.

Cristaldi M, Ieradi LA, Udriou I, Zilli R. 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutation Research* 559: 1–9.

Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Martínez R, Graf U, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S. 1995. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 341: 235-247.

CONAMA, 2005 - Resolução Nº 357 de 17/03/2005 do Conselho Nacional de meio Ambiente. MMA. Brasil.

Donbak L, Rencüzogulları L, Yavuz A, Topaktas M. 2005. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutation Research* 588: 82–87.

Dorea JG, Antonio C, Barbosa AC, Silva GS. 2006. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142(3-4): 275-283.

Durako MJ, Venwosthu WJ, Fatemy SMR, Valavi H, Thayer GW .1993. Assessment of the toxicity of Kuwait crude oil on the photosynthesis and respiration of sea grasses of the northern gulf. *Marine Pollution Bulletin* 27: 123–227.

FEMA, 2003. Projeto Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado De Bacia Hidrográfica Para O Pantanal E Bacia Do Alto Paraguai - Agencia Nacional das Águas/Fundo para o Meio Ambiente Mundial/Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente/Organização dos Estados Americanos. Resumo Executivo do Relatório Final. Disponível em www.ana.gov.br/gefap - Componente III, acesso em 20/07/2006.

Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. Toxicology Letters 140-141: 353-365.

Frölich A, Würgler FE. 1990. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Research 234(2): 71-80.

Graf U, Heo OS, Ramirez OO. 1992. The genotoxicity of chromium(VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. Mutation research 266(2): 197-203.

Grisolia CK, Cordeiro CMT. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. Genetics and Molecular Biology 23(1): 235-239.

Grisolia CK, Starling FLR. 2001. Micronuclei monitoring of fish from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutation Research 491: 39-44.

Grisolia CK, Oliveira ABBO, Bonfim H, Klautau-Guimarães MN. 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and Molecular Biology 28(2): 334-338.

Hamilton SK, Sippel SJ, Calheiros DF, Melak JM. 1997. Na anoxic event and other biogeochemical effects of the Pantanal wetland on the Paraguay River. Limnology. Oceanography 42(2): 257-272.

Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinai N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano, N, Sofuni T, Ojima Y. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic Organisms. Mutation Research 399: 125–133.

Hewitt LM, Marvin H. 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. Mutation Research 589: 208–232.

Horn RC, Rocha JA, Vargas VM. 2004. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis* 19(6): 445-51.

Kuljukka-Rabb T, Peltonen K, Isotalo S, Mikkonen S, Rantanen L, Savela K. 2001. Time- and dose-dependent DNA binding of PAHs derived from diesel particle extracts, benzo[a]pyrene and 5-methylchrysene in a human mammary carcinoma cell line (MCF-7). *Mutagenesis* 16 (4): 353-358.

Krumschnabel G, Nawaz M. 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 70: 159–167.

Lemos CT, Erdtmann B. 2000. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutation Research* 467: 1–9.

Lima ROA, Bazo AP, Salvadori DMF, Rech CM, Oliveira DP, Umbuzeiro GA. 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research* 626: 53–60.

Masten LW, Boeri RL, Walker JD. 1994. Strategies employed to determine the acute aquatic toxicity of ethyl benzene, a highly volatile, poorly water-soluble chemical. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 27: 335–348.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 148-158.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Bai J. 2004. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 19(6): 465-468.

Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367: 245–251.

Minissi S, Caccese D, Passafiume F, Grella A, Ciccotti E, Rizzoni M. 1998. Mutagenicity_micronucleus test in *Vicia faba* root tips/, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber River and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutation Research* 420: 77–84.

Nepomuceno JC, Ferrari I, Spanó MA, Centeno AJ. 1997. Detection of Micronuclei in Peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 293-297.

Oros DR, Ross JRM. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Estuary sediments. *Marine Chemistry* 86(3-4): 169-184.

Paixão JF, Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBL, Carvalho GC, Severiano J, Rebouças M, Matias GRA, Rodrigues ILP (2007) Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environmental Research*- article in press – www.sciencedirect.com (visitado em 05/01/2007).

Palhares D, Grisolia CG. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology* 25(3): 281-284.

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Spanó MA. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47(3): 219 – 224.

Prá D, Lau AH, Knakievicz T, Carneiro FR, Erdtmann B. 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research* 585(1-2): 79-85.

Reifferscheid G, Grummt T, 2000. Genotoxicity in German surface waters - results of a collaborative study. *Water, Air, and Soil Pollution* 123: 67–79.

Rencüzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktas M. 2001. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutation Research* 490: 107–112.

Rodriguez AL, Bellinaso ML, Dick T. 1989. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinate dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 94(1): 65-69.

Sánchez-Galán S, Linde AR, Izquierdo JI, García-Vázquez E. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research* 412: 219-225.

Sakuragui MM, Paulino MG, Henrique HS, Fernandes MN. 2007. 16.P13. Na⁺/K⁺-ATPase activity in the fish gills of *Pimelodus maculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 148(1): S73.

Sharma H, Jain VK, Khan ZH. 2007. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. *Chemosphere* 66: 302–310.

Stahl RGJr. 1991. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewater. *Ecotoxicology and environmental Safety* 22: 94-125.

Seigneur C, Constantinou E. 1995. Chemical Kinetic Mechanism for Atmospheric Chromium. *Environmental Science and Technology* 29: 222-231.

Schmid W. 1975. Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis in: Hollanender A. Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection. Plenum Press, New York and London 4(36): 31-53.

Vargas VMF, Horn RC, Guidobono RR, Mittelstaedt AB, Azevedo IG. 1998. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. Genetics and Molecular Biology 21(2): 247-253.

Vargas VMF, Ducatti A, Horn RC. 2001. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. In Tucci, CEM. and Marques, DML.M. (eds), Avaliação e controle da Drenagem Urbana. ABRH, Porto Alegre, vol. 2, p. 548.

Zhao X, Wan Z, Zhu H, Chen R. 2003. The carcinogenic potential of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 540(1): 107-117.

Wise SS, Holmes AL, Ketterer ME, Hartsock WJ, Fomchenko E, Katsifis S, Thompson WD, Wise JP. 2004. Chromium is the proximate clastogenic species for lead chromate-induced clastogenicity in human bronchial cells. Mutation Research 560: 79–89.

Wise SS, Holmes AL, Wise JP. 2006. Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 610(1-2): 2-7.

Yi H, Meng Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutation Research 537: 109–114.

White PA, Rasmussen JB. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. Mutation Research 410: 223–236.

White PA. 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research* 515: 85–98.

www.caceres.mt.gov.br – acesso em 04/08/2006.

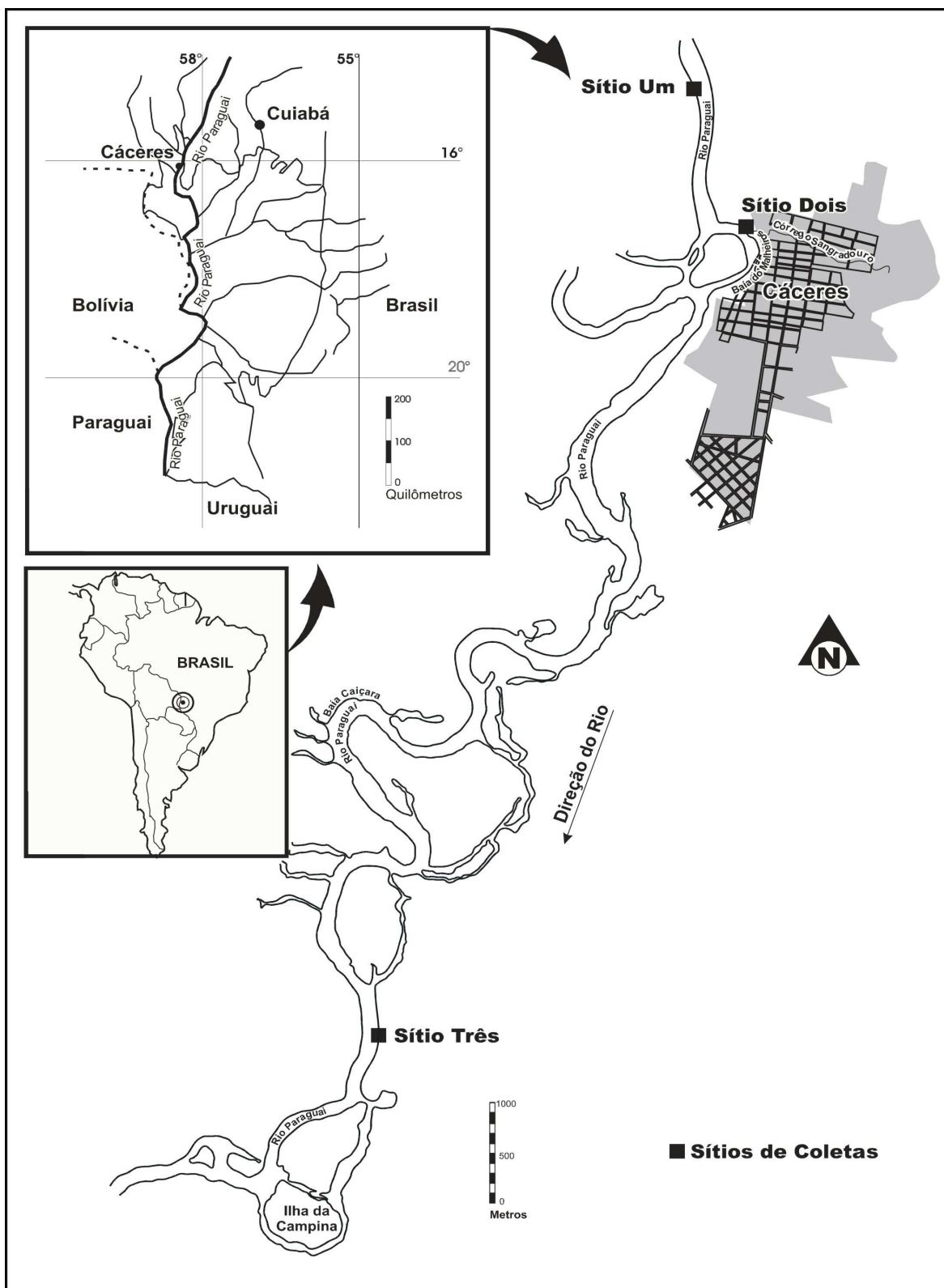


Figura - 1. Localização de Cáceres e dos sítios de estudo.

Tabela I - Análises físico-químicas conduzidas durante as coletas feitas no Rio Paraguai

	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3
Abril de 2004 (Cheia)			
Altura do nível do rio (m)*	3.64	3.64	3.64
pH	7.30	6.70	8.25
Temperatura da água (°C)	28.7	29.1	28.8
Condutividade elétrica (µS.cm ¹)	46	176	46
Oxigênio dissolvido ((mg.l ¹)	+4.98	+1.42	+4.60
Turbidez (NTU)	15	20	16
Agosto de 2004 (seca)			
Altura do nível do rio (m)*	1.38	1.38	1.38
pH	6.13	6.74	6.25
Temperatura da água (°C)	26.4	26.2	26.7
Condutividade elétrica (µS.cm ¹)	26	441	180
Oxigênio dissolvido ((mg.l ¹)	7.75	7.12	8.04
Turbidez (NTU)	13	21	25

* Dados fornecidos pela Marinha do Brasil: Agência Fluvial de Cáceres, MT – Brasil

Tabela II - Resultados das análises químicas das amostras de água e sedimento feitas no Rio Paraguai em abril e agosto de 2004

Parâmetros analisados	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3
Agosto de 2004 (Água)			
Sulfetos (mg/L)	Nd	*13,6	*92,9
Sólidos suspensos (mg/L)			
105°C	52	152	148
Cromo (mg/L)	0,04	©0,09	©0,97
Abril de 2004 (Sedimento)			
Sulfetos (ppm)	Nd	Nd	*31,42
Cromo (ppm)	Nd	Nd	©5,4
Matéria orgânica (%)	0,12	4,22	Nd
Óleos e graxas (ppm)	#0,05	#0,19	Nd
Agosto de 2004 (Sedimento)			
Cromo (ppm)	©3,9	©6,9	©6,0
Sulfetos (ppm)	Nd	Nd	*80,4
Matéria Orgânica (%)	0,06	5,19	1,30
Óleos e graxas (ppm)	#0,05	#2,95	#5,74

Nd = não detectado

Tabela III - Frequências de células micronucleadas (CMN) e micronúcleos (MN) em eritrócitos periféricos de *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici* coletados no Rio Paraguai, no trecho da cidade de Cáceres – MT, em abril e agosto de 2004

Espécies/coletas/Sítios	Nº. de indivíduos	Total de células	Total de MN	Total de CMN	X (%) ± SD	
					MN	CMN
<i>Pimelodus maculatus</i>						
Abril de 2004						
Sítio 1 (Referência)	10	40.000	105	103	0.105 ± 2.41	0.103 ± 2.41
Sítio 2	4	16.000	86	84	0.215 ± 1,65*	0.210 ± 1,22*
Sítio 3	11	44.000	249	249	0.226 ± 6,30*	0.221 ± 6,33*
Agosto de 2004						
Sítio 1 (Referência)	11	44.000	147	141	0.133 ± 4.18	0.137 ± 5,40
Sítio 2	10	40.000	270	258	0.270 ± 8.01*	0.258 ± 6,70*
Sítio 3	10	40.000	313	307	0.315 ± 7,60*	0.305 ± 8,38*
<i>Leporinus friderici</i>						
Agosto de 2004						
Sítio 1 (Referência)	4	16.000	38	38	0.095 ± 1,80	0.095 ± 1,80
Sítio 3	11	44.000	274	270	0.249 ± 4.01*	0.245 ± 4.09*

* Diferença significativa quando comparado com o referência (Sítio 1) de acordo com o Teste U (Mann-Whitney), com nível de significância $\alpha = 0,05$.

ANEXOS:

**1) GENOTOXICITY OF WATER FROM THE PARAGUAY RIVER
NEAR CÁCERES – MT, BRAZIL IN THE DROSOPHILA WING-
SPOT TEST. - Manuscript for Environmental and Molecular Mutagenesis**

**2) EVALUATION OF THE QUALITY OF WATER OF PARAGUAY
RIVER, CÁCERES - MT, BRAZIL, USING THE MICRONUCLEUS
TEST ON FISH (MNTF) AND CHEMICAL ANALYSES. - Manuscript**

Manuscript for Environmental and Molecular Mutagenesis

**Genotoxicity of water from the Paraguay River near Cáceres – MT, Brazil in
the Drosophila Wing-Spot Test**

**Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta^{1,2}, Júlio César Nepomuceno², Luiz Alfredo
Pavanin³**

**¹UNEMAT – University of the State of Mato Grosso, Institute of Natural and
Technological Sciences, Cáceres *Campus* – MT, Brazil**

**²UFU - Federal University of Uberlândia, Institute of Genetics and
Biochemistry, Umuarama Campus, Uberlândia – MG, Brazil**

**³UFU – Federal University of Uberlândia, Institute of Chemistry, Santa
Mônica Campus, Uberlândia – MG, Brazil**

**Mail to: Júlio César Nepomuceno, Federal University of Uberlândia, Institute
of Genetics and Biochemistry, Laboratory of Mutagenesis. Av. Pará 1720,
Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil.**

E-mail: nepomuceno@ufu.br Phone: +55 (34) 3218 –2505; Fax: +55 (34) 32182203.

Abstract:

The genotoxic activity of surface water samples from four sites along the Paraguay River, near Cáceres, Mato Grosso State, Brazil, was investigated using the *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). Effluents from sanitary sewers and agroindustrial effluents (residual effluents from slaughterhouses, leather tanneries, and dairies) flow into the Paraguay River, and directly or indirectly contaminate water from sampling Sites 1-3; Site 4 was an upriver reference site that received no domestic or agroindustrial discharges. Water was collected at 4 time periods, September 2003 and August 2004 (periods of low water or drought), and April 2004 and March 2005 (periods of high water or flood). Chromium concentrations above statutory limits were detected at Sites 1-3 (August 2004), and Sites 1, 2 and 4 (March 2005). Sulfur compounds were also detected for Sites 1-3. The SMART performed using standard (ST) cross flies detected genotoxic responses in only two samples, the August 2004 Site 1 sample and the March 2005 Site 2 sample. Many more samples were positive using high bioactivation (HB) cross flies: Site 1 (all collection periods), Site 2 (September 2003 and April 2004), and Site 3 (September 2003 and August 2004). Mutant frequency comparisons between marker-heterozygous and balancer-heterozygous flies from the HB cross indicated that the positive genotoxic responses for the Site 2 (April 2004) and Site 3 (September 2003) samples were due mainly to mitotic recombination. Our findings indicate that the section of the Paraguay River within the urban perimeter of Cáceres is contaminated with genotoxic agents.

Key words: Cáceres; *Drosophila* Wing-Spot Test; Paraguay River; Genotoxicity.

INTRODUCTION

The Pantanal (the Swampland) is the largest floodable plain in the world with an area of approximately 138,183 km². It is composed of a myriad of different environments that sustain both aquatic and terrestrial biodiversity. The fragile balance between the Pantanal ecosystems is maintained by the rhythm of flooding. This balance is threatened by economic growth that has resulted in changes in the hydraulic geometry of the river due to deforestation and alterations to the surrounding natural areas. These changes are more evident in the basin of the Paraguay River, where the waters flow into the Pantanal [Da Silva, 2000]. The Paraguay River is the main tributary feeding into the High Paraguay basin [Assine and Soares, 2004].

The water flowing into the Paraguay River basin originates in the Plateau of Parecis, the great divisor of waters between the Amazonica and the Platina basins, in the state of Mato Grosso. This system drains the Depression and Plain of the Pantanal in the state of Mato Grosso, flowing toward Paraguay and Argentina. As a result, the Paraguay River system drains several environments containing a variety of plants, and feeding into a region that is one of the richest in Brazil, with a diversity of plant and animal species [FEMA, 2003].

In recent years, the city of Cáceres, known as the Gate of the High Swampland, and its surrounding suburban areas have experienced a period of disorderly growth resulting from the expansion of farming, stockbreeding, and the urban population. This growth has had environmental impacts that have negatively affected the quality of life of the area's residents [Iocca, 2000]. In particular, discharges from slaughterhouses, tanneries, and dairies in and near Cáceres may stress the aquatic environment. In addition, the International Fishing Festival, the

largest fresh water fishing festival in the world, takes place in Cáceres once a year, and it contributes to the negative impacts on the Paraguay River. Finally, the plan by the Brazilian, Bolivian, and Paraguayan governments for a massive navigation and hydroelectric dam project, the '*hidrovia*', is proceeding without an adequate Environment Impact Assessment [WWF 2001]. The *hidrovia* would dredge and redirect the Paraguay and Paraná Rivers to create a 3,442 km long navigation channel at least 3 m (~10 ft) deep between Cáceres, Brazil and the harbor of Nueva Palmira in Uruguay.

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila melanogaster* wings [Graf et al., 1984] has been used extensively to evaluate the genotoxicity of environmental samples [Delgado-Rodriguez et al., 1999; Amaral et al., 2005, 2006; Pantaleão et al., 2007]. Although there are several tests that can detect genotoxicity, only a rather small number have been used to evaluate complex mixtures [Claxton et al., 1998]. The SMART has been used to investigate the genotoxicity of simple composites [Frölich and Würigler, 1990b; Spanó et al., 2001], as well as complex mixtures [Frölich and Würigler, 1990a] of various origins [Guzmán-Rincón and Graf, 1995; Sousa et al., 2003; Sarakaya and Çakir, 2005]. The SMART is capable of testing the genotoxicity of both stable and unstable composites, including chemical composites and composites dissolved in water and air [Graf et al., 1984]. Of importance to this present study, the SMART has been used to detect genotoxicity in the aquatic environment [Amaral et al., 2006], including fluvial water [Pantaleão et al., 2007].

In the present study, we have used the SMART to evaluate the genotoxicity of the surface water of the Paraguay River in the vicinity of Cáceres-MT. This portion of the river receives discharges from sanitary sewers, industrial and

agricultural effluents, and water from the polluted Paraná-Paraguay waterway, as well as being impacted by tourists using the river. No previous studies have evaluated the genotoxicity of the river water.

MATERIAL AND METHODS

Positive control

Urethane (URE) (ethyl carbamate; $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$; CAS N° 51-79-6; Fluka, Buchs, Switzerland) was used as the positive control. URE is positive in the standard (ST) cross and the High Bioactivation (HB) *Drosophila* crosses in the SMART, producing greater response in HB flies [Frölich and Würigler, 1990b]. A stock solution of 10 mM URE was prepared in distilled water.

Samples sites and water collection

Cáceres is situated on the east bank of the Paraguay River, coordinates 16°11'42" latitude South and 57°40'51' longitude West, 118 m above sea level, and 209.7 km from the capital city of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil (Fig. 1). Paraguay River surface samples were collected from four locations near Cáceres – MT on four dates. Two of the collections were conducted during the low water period (drought), September 2003 and August 2004, and two during the high water period (flood), April 2004 and March 2005. March and April are considered the height of the regional flooding period [Hamilton et al., 1996].

Sites:

- 1) – Receives discharges from tanneries; located 11,500 m downstream of Site 3;
- 2) – Receives discharges from a large slaughterhouse; located 4,500 m downstream of Site 3;

- 3) – Receives all kinds of urban waste; located at S 16°03' 40. 9" W 57°41' 19. 7" where the Córrego Sangradouro (Sangradouro Stream) discharges effluents from sanitary sewers into Malheiros Bay, inside the urban perimeter;
- 4) – Used as a reference site, presumed to have low levels of pollutants; located 1,200 m upstream of Site 3, close to the urban perimeter.

The water samples (1 L) were collected in disposable polypropylene tubes, immediately frozen, and transported to the Mutagenesis Laboratory/ INGEB/UFU, where the treatments were conducted in two stages.

Physicochemical analysis of water samples

Physicochemical analysis of the water samples was carried out using standard methods of the ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas, www.abnt.org.br), the agency responsible for standardizing chemical analysis techniques in Brazil. At the time of each water collection, data were gathered on the depth of the river water, and the pH (ABNT-MB1589/89), temperature, dissolved oxygen (ABNT-MB3030/89), electric conductivity (ABNT-NBR14340/90), and turbidity (ABNT-MB3227/90) of the samples. The water samples collected in August 2004 and March 2005 were analyzed for sulfur (S) compounds (ABNT-NBR11642/90), chromium (Cr) compounds (ABNT-NBR13814/89), floating solids (ABNT-NBR10664/89), Chemical Oxygen Demand (COD; ABNT-NBR1035/92), Biochemical Oxygen Demand (BOD; ABNT-NBR12614/92), oils and greases (ABNT-NBR13348/95), and sedimented solids (ABNT-NBR10561/88) in the Laboratory of Chemistry of the Federal University of Uberlândia. Chromium compounds were analyzed with the utilization of an Atomic Absorption Spectrophotometer, CG model AA905, with detection limit of 0.01mg/L and sulfur compounds were analyzed by colorimetric methods with detection limit of 0.1mg/L.

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART):

Drosophila strains and crosses

The SMART detects genotoxic events in the F₁ generation of *Drosophila* crosses. The genetic markers *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) and *flare* (*flr*³, 3-38.8), found on chromosome 3 of the wing imaginal disc in *Drosophila melanogaster* larvae, are expressed as different phenotypes, visible on the surface of the wing of the adult fly. The test measures loss of heterozygosity for these markers [Guzmán-Rincón and Graf, 1995].

Two kinds of crosses were used: 1 - Standard (ST) cross, virgin *flr*³/*In(3LR)TM3, ri p^D sep l(3)89Aa bx^{34e} and Bd^S* females were crossed with *mwh/mwh* males [Graf et al., 1989]; and 2 – the High Bioactivation (HB) cross, virgin *ORR/ORR; flr*³/*In(3LR)TM3, ri p^D sep l(3)89Aa bx^{34e} and Bd^S* females were bred with *mwh/mwh* males [Graf and van Schaik, 1992]. The *ORR* strain used for the HB cross is particularly sensitive to some genotoxins, because it has high constituent expression of the cytochromes P450 that render it resistant to DDT (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane) [Hällström and Blanck, 1985].

Two kinds adult of descendants were generated from both crosses: marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) flies. The descendants were phenotypically distinct, based on the marker *TM3, Bd^S*. The adult MH (*mwh* +/+ *flr*³) flies had normal wings with smooth edges, while BH (*mwh* +/+ *TM3, Bd^S*) flies, because they possess a balancing chromosome with multiple inversions and a dominant marker (*TM3, Bd^S*), have wings with serrated edges [Guzmán-Rincón and Graf, 1995]. The comparison of the spot frequencies for these two genotypes was used to quantify the relative recombinagenic activities of the test agents [Lehmann et al., 2003].

Egg collection, treatment of larvae, and analysis of adult wings

ST and HB crosses were produced at the same time. The eggs from these two crosses were collected for a period of 8 hr and placed in flasks containing a solid agar base (4% w/v agar-agar in water), covered with a layer of medium prepared with yeast and enriched with sugar. Three-day larvae, in the third embryonic development stage, were washed in tap water and transferred to glass vials containing 1.5 g of instant mashed potatoes (Yoki, São Bernardo do Campo, Brazil) rehydrated with 5 mL of undiluted Paraguay River water sample. Deionized water was used as a negative control. The entire treatment procedure was conducted at 25°C and at 65% relative humidity. The treatments were conducted in two stages. In the first stage we assayed the water samples from September 2003 and April 2004, while samples from August 2004 and March 2005 were assayed in the second stage.

After they emerged, the adult flies were collected and put into flasks containing 70% ethanol. The wings of the flies were removed and mounted in Faure's solution (30 g of mucilage, 20 mL glycerol, 50 g choral hydrate, 50 mL water). The spots were analyzed at 400X magnification [Graf et al., 1984, 1989].

Two kinds of spots were observed in the wings of MH flies: 1- simple, single spots (*mwh* or *flr*³), with *mwh* spots being the more frequent; and 2- twin spots (*mwh* adjacent to *flr*³). Single spots can be produced by point mutation, deletion, chromosome loss (aneuploidy), crossing-over during mitosis, and by other causes, while twin spots are produced only by somatic recombination [Graf et al., 1984; Frei and Würigler, 1996]. In the BH genotype, *mwh* spots reflect predominantly somatic point mutation and chromosome aberration, since mitotic recombination involving the balancer chromosome and its structurally normal homologues are

probably nonviable [Vogel et al., 1999]. The wings from BH flies were scored only when positive responses were obtained with MH flies.

Statistical analysis

The frequency of each type of mutant clone in river water treated flies was compared pair-wise to the negative control frequency using the conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman [1970]. The possible outcomes from this test are positive, weak-positive, negative, or inconclusive [Frei and Würgler 1988].

RESULTS

The physicochemical data obtained at each sample collection are shown in Table I. Table II shows the results of the chemical analysis on samples collected in August 2004 and March 2005. S compounds were detected in Site 1, 2, and 3 samples, during both the drought period of August 2004 and the flood period of March 2005. Especially high concentrations of S were found for Site 1, with higher concentrations being found during the drought period. We also found Cr in all four of the sampling sites. We found floating solids in all the August 2004 and March 2005 samples, and oils and greases in the samples collected in March 2005.

Table III shows the results of the SMART assay on Paraguay River surface water samples conducted with *Drosophila* from ST and HB crosses. For ST cross flies, statistically significant increases in the frequency of spots in MH descendants were detected only for the Site 1 sample from August 2004 and the Site 2 sample from March 2005.

As for assays performed with the HB cross, significant increases in the frequency of spots in MH descendants were detected with all Paraguay River samples collected at Site 1; the September 2003 and April 2004 samples from Site 2; and the September 2003 and August 2004 samples from Site 3. Comparisons of the spot frequencies in the MH and BH descendants of the HB cross indicated that recombination accounted for 58.40% of the genotoxic activity in the April 2004 samples from Site 2; and 62.16% of the genotoxic activity detected in the September 2003 samples from Site 3.

All of the samples from Site 4, the presumably clean reference site, were negative for genotoxic activity in both the ST and HB crosses.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The physicochemical observations in Table I indicate that there were relatively large differences for all the observed parameters between the various sampling sites and between periods of drought and flooding. There were differences for electric conductivity and the concentration of nutrients in samples taken at each of the study sites during periods of drought and flooding. However, there also were variations within periods. Similar observations were reported by Abdo and Da Silva [2004] for bodies of water in the Corutuba Nesting, Pantanal - MT, a tributary of the Paraguay River. Also the limnologic characterization of the Sangradouro Stream, a tributary of the Paraguay River in the urban perimeter of Cáceres, conducted by Iocca [2000] demonstrated that the highest values were obtained during the drought. Iocca found significant differences between periods of drought and rain with regards to total suspended material, electric conductivity,

and total pigment. These differences presumably were due to dilution caused by the rain.

According to Brazilian legislation [CONAMA, 2005], the waters of a class 2 river, like the Paraguay River, should contain no more than 0.002 mg/L S compounds and 0.05 mg/L Cr compounds. Therefore, amounts of Cr exceeding the legal limit were detected for Sites 1 - 3 (August 2004), and Sites 1, 2 and 4 (March 2005). S compounds, in the form of sulfur dioxide (SO_2) and its hydrate, bisulfite (HSO_3^-) and sulfite (SO_3^{2-}), were also detected for Sites 1 - 3. HSO_3^- is genotoxic in animal and plant cells [Yi and Meng, 2003], while sodium SO_3^{2-} - HSO_3^- mixtures are genotoxic in rats [Meng et al., 2004]. Sodium metabisulfite induces chromosome aberrations (chromatid and chromosome breakage), and dose-dependent sister chromatid exchange in human lymphocytes [Rencüzogullari et al., 2001]. It also is possible that organic matter in the water consumes oxygen, precipitating other processes, in particular eutrofication in the presence of S compounds.

Cr-contaminated soil is genotoxic and, for some individuals, Cr acts as a strong allergen [Wang, 1999]. Exposure to high concentrations of Cr (III) for extended periods of time is genotoxic [Çavas and Ergene-Gözükar, 2005], although it was not genotoxic in the SMART [Graf et al., 1992]. Cr (VI) is carcinogenic [Çavas and Ergene-Gözükar, 2005], intensely and acutely toxic for the blood cells of aquarium fish [Krumschnabel and Nawaz, 2004], and clastogenic in human lung cells [Wise et al., 2004]. Cr (VI) oxide is positive in the SMART using both chronic and acute treatments and more than 90% of the genotoxicity is due to mitotic recombination [Graf et al., 1992]. Matsumoto et al. [2006], who used the micronucleus test, the Comet assay, and measured

chromosome aberrations in onion root-tips, detected genotoxicity and mutagenicity in water contaminated with tannery effluents. Matsumoto found genotoxic effects in onion root-tip cells and in erythrocytes from fish exposed to water with a total Cr concentration of 0.01 mg/L. All of the water samples that were assayed in the present study had Cr concentrations higher than 0.01 mg/L (Table II).

Site 1 was located at a discharge point for tannery effluents, and in August 2004 part of the discharge pipe which carries the effluents to the bottom of the river had been disconnected. The appearance of the water was milky, the water had a bad smell, and there were several dead fish a few meters downriver from the sampling site. The August 2004 water from Site 1 reduced the emergence of flies from treated larvae from both the ST and HB crosses by almost 60%. Therefore, the tannery effluents flowing into Site 1 were quite cytotoxic.

The Site 2 data suggested that the genotoxicity of the effluents discharged at this location varied with time; no activity was detected with either the ST or HB cross for the August 2004 samples, and the other samples from this site were positive in one cross, but not both. It is possible that the variability in genotoxic responses corresponded with the rate and types of discharges from the slaughterhouse operation.

Only the Site 3 water samples collected during periods of drought were genotoxic, possibly due to the concentration of genotoxins in these samples. Besides the S and Cr compounds detected in the present study, the effluents emptying into this site contained material from domestic sanitary sewers, and discharges from hospitals, mechanical shops, and a gas station [Iocca, 2000].

All the Site 4 samples were negative in the SMART assay, regardless of the cross used or the time of the sampling. This response was consistent with our expectation of this site as a 'clean' reference site. Although Site 4 water had a low level of Cr, this was not sufficient to induce a significant increase in the frequency of mutant spots. The Cr found at this site may be a natural component of the soil, or, as demonstrated by Laabs et al. [2002], it could be the result of fertilizer contamination carried from agricultural and pasture areas on the uphill part of the river in Cáceres. It is also possible that the Cr is trivalent (Cr(III)), which is not genotoxic in the SMART [Graf et al., 1992].

A study by Vila [2004], that examined morphofunctional alterations of the liver and erythrocyte micronuclei in *Piaractus mesopotamicus*, surmized that water collected in 2001 and 2002 from the Paraguay River bays around the Cáceres region, including the city watershed, were contaminated by Cr(VI) from tannery effluents. That study, however, in contrast with this present one, did not conduct a chemical analysis of the water. Therefore, it is possible that S compounds also contributed to the genotoxicity that was found in Sites 1, 2, and 3 in this present study. Studies have found that S compounds are toxic in several test organisms [Yi and Meng, 2003; Meng et al., 2004; Yi et al., 2005].

Effluents in the form of complex mixtures are often discharged into aquatic environments, but knowledge about the toxic components in these effluents is usually either nonexistent or there is a lack of understanding about how the toxicants interact with other components in the effluents [Hewitt and Marvin, 2005]. Thus, the genotoxicity detected in the present study may have been induced by Cr and/or S, floating solids, oils and greases (hydrocarbons), or even by other compounds not analyzed in the river water. Interactions between these

contaminants may have produced additive, antagonistic, or synergistic responses in the SMART assay.

We found more positive responses using high bioactivation (HB) cross flies. According to Delgado-Rodriguez et al. [1995], hydrocarbons induced greater genotoxic responses in the HB cross than in the ST cross. In contrast, Cr compounds are equally genotoxic in the two crosses [Graf et al., 1992]. Thus, it is possible that the oils and greases in the Paraguay River (and not the Cr compounds) were responsible for the increased genotoxicity in the HB flies. The presence of oils and greases could be caused by the pollution of the *hidrovia* or by the International Fishing Festival held in Cáceres. These activities destroy habitats in the Pantanal by increasing the drainage capacity of the river outlet, affect native fish populations, and expose the river system to the invasion of exotic species through links to rivers in the Amazon basin [WWF, 2004]. In this case, the pollution would directly affect local indigenous communities whose livelihoods depend on the fish and biological resources of the Pantanal, particularly in Brazil's Mato Grosso State and in riverine communities in Paraguay.

Samples obtained from environmental sources are complex mixtures of organic and inorganic compounds consisting of thousands of individual components which can interact to produce additive, synergistic or antagonistic effects [Reifferscheid and Grummt, 2000; Vargas et al., 2001; Fent, 2003], which makes it difficult to associate particular chemical species with biological effects. Hence, predicting toxicity based on the chemical analysis of isolated substances may provide misleading information about the genotoxic effects of complex mixtures on live organisms [Vargas et al., 2001]. Also, in the case of environmental samples, it is usual that few of the components are present in high

concentrations [Stahl, 1991]. Therefore, the reason for genetic damage cannot be attributed to a single agent, due to the constitution of complex mixtures [Donbak et al., 2005]. In our study, for instance, the highest concentrations of Cr detected in the water samples (1mg/L or 0.1 mM) were approximately 100-fold lower than those necessary to produce a positive response in the SMART assay, even assuming that all the Cr in the water samples was present as highly genotoxic Cr(VI) form [Graf et al., 1992].

In summary, the SMART detected genotoxicity in water samples from the Paraguay River in Cáceres and demonstrated that the descendants from the HB cross were more sensitive to the genotoxicity of the river water than ST cross flies. The genotoxicity was limited to samples from Sites 1, 2, and 3, which received discharges containing potentially genotoxic domestic, agricultural, and industrial waste, and the genotoxicity was mainly due to mitotic recombination, especially in the case of water from Sites 2 and 3. Chemical analyses of the water samples detected S, Cr compounds, floating solids, and oils and greases, some of which are considered genotoxic agents. We suggest that the SMART assay be further explored as a rapid, sensitive, and inexpensive method for evaluating the genotoxicity of natural aquatic environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the University of the State of Mato Grosso (UNEMAT/ICNT/*Campus* Cáceres), Coordination of the Improvement of Superior Personnel (CAPES), for financial support and the Federal University of Uberlândia for approval of the project. We also express our gratitude to the collection: Professor Ms. Claumir César Muniz, Professor Paulo Luiz da Silva, Sr. Heloísio

José Benacchio, Marcelo Tomaz da Silva, Professor Renata Miranda Cebalho and Professor Josefa Silva dos Santos.

REFERENCES

Abdo MSA, Da Silva CJ. 2004. Limnological characteristics of the water bodies of the corutuba nesting site in Brazil's Pantanal. *Acta Limnologia Brasiliensia* 16: 359-368.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Available at: <http://www.abnt.org.br> [Accessed 20 June 2005].

Amaral VS, Da Silva RM, Reguly ML, Andrade HHR. 2005. *Drosophila* wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat Res* 583: 67-74.

Amaral VS, Sinigaglia M, Reguly ML, Andrade HHR. 2006. Genetic toxicity in surface water from Guaíba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Environ Pollut* 139: 469-476.

Assine ML, Soares PC. 2004. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International* 114: 23–34.

Çavas T, Ergene-Gözükar S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum

refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74: 264–271.

Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ. 1998. Minireview - Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res* 410: 237–243.

CONAMA. 2005. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de meio Ambiente. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> [Accessed 10 May 2006].

Da Silva CJ. 2000. Ecological basis for the management of the Pantanal – Upper Paraguay River Basin. In: Smits A.JM, Nienhuis PH, Leuven RSEW. (Eds). *New approaches to river management*. Backuys Publishers, Leiden, pp 97-117.

Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Marttelo R, Graf U, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S. 1995. Genotoxic 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, Graf U. 1999. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 39: 33–43.

Donbak L., Rencüzogulları L., Yavuz A., Topaktas M., 2005. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res* 588: 82–87.

FEMA. 2003. Projeto Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado De Bacia Hidrográfica Para O Pantanal E Bacia Do Alto Paraguai - Agencia Nacional das Águas/Fundo para o Meio Ambiente Mundial/Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente/Organização dos Estados Americanos. Resumo Executivo do Relatório Final. Available at: <http://www.ana.gov.br/gefap> [Accessed 20 July 2006].

Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 140-141: 353-365.

Frei H, Würgler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* 203: 297–308.

Frei H, Würgler FE. 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, Würgler FE. 1990a. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 234: 71-80.

Frölich A, Würgler FE. 1990b. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244: 201-208.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagenesis* 6: 53–188.

Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222: 359–373.

Graf U, Heo OS, Ramirez OO. 1992. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat Res* 266: 197-203.

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

Guzmán-Rincón J, Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM et al., editors. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. New York: Plenum Press. pp 169–181.

- Hällström 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.
- Hamilton SK, Sippel SJ, Melack JM. 1996. Inundation patterns in the Pantanal wetland of South America determined from passive microwave remote sensing. Archiv für Hydrobiologie 137: 1-23.
- Hewitt L.M, Marvin CH, 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. Mutat Res 589: 208–232.
- Iocca FA. 2000. Caracterização Limnológica do Córrego Sangradouro nas épocas de seca e de chuva - Cáceres/MT. Dissertação de mestrado – Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília. 57 p.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 9: 527-549.
- Krumschnabel G, Nawaz M. 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. Aquat Toxicol 70: 159–167.
- Laabs V, Amelung W, Pinto AA, Wantzen M, Da Silva CJ, Zech W. 2002. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the Northeastern Pantanal Basin. Brazil J Environ Qual 31: 1636-1648.

- Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML, Andrade HHR. 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539: 167–175.
- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology* 29: 148-158.
- Meng Z, Qin G, Zhang B, Bai J. 2004. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 19: 465-468.
- Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Pavanin LA, Graf U, Rezende AAA, Valadares BLB, Fragiorgio EJ, Souza NC, Gutierrez ZR, Spanó MA. 2007. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil using the *Drosophila* Wing Spot Test. *Environ Mol Mutagen* 48: 96-105.
- Reifferscheid G, Grummt T. 2000. Genotoxicity in German surface waters - results of a collaborative study. *Water, Air, and Soil Pollution* 123: 67–79.
- Rencüzogullari E, İla HB, Kayraldiz A, Topaktas, M. 2001. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human

lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat Res* 490: 107–112.

Sarikaya R, Çakir S. 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila*_wing spot test. *Environ Toxicol Pharmacol* 20: 424-430.

Sousa NC, Carvalho S, Spanó MA, Graf U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extracts from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 41: 293–299.

Spanó MA, Frei H, Würigler FE, Graf U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16: 385–394.

Stahl RG Jr. 1991. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22: 94-125.

Vargas VMF, Ducatti A, Horn RC. 2001. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. In Tucci CEM. Marques DMLM. (eds), *Avaliação e controle da Drenagem Urbana*. ABRH, Porto Alegre, vol. 2, p. 548.

- Vila VB. 2004. Efeito da poluição aquática por cromo nos aspectos fisiológicos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) do Rio Paraguai, Cáceres/MT. Tese de Doutorado do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas. Manaus – AM (Brasil) 116 p.
- Vogel EW, Graf U, Frei HJ, Nivard MMJ. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: McGregor, DB, Rice, JM, Venitt S (Eds), The Use of Short and Medium-Term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation, IARC Science Publication 146: 427-470.
- Wang H. 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutat Res* 426: 147–149.
- Wise SS, Holmes AL, Ketterer ME, Hartsock WJ, Fomchenko E, Katsifis S, Thompson WD, Wise JP Sr. 2004. Chromium is the proximate clastogenic species for lead chromate-induced clastogenicity in human bronchial cells. *Mutat Res* 560: 79-89.
- WWF. 2001. Pantanal (NT0907). Wild World Report. Unpublished report to WWF - US, Washington DC. Available at: http://www.worldwildlife.org/wildworld/profiles/terrestrial/nt/nt0907_full.html [Accessed 10 May 2006].
- WWF. 2004. Dam Right: Rivers at Risk. WWF Dams Initiative. WWF International: Gland, Switzerland.

<<https://intranet.panda.org/data/downloads/10060/riversatriskfinalfullreport.pdf>>

Yi H, Meng Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutat Res* 537: 109–114.

Yi H, Liu J, Zheng K. 2005. Effect of sulfur dioxide hydrates on cell cycle, sister chromatid exchange, and micronuclei in barley. *Ecotoxicol Environ Safety* 62: 421–426.

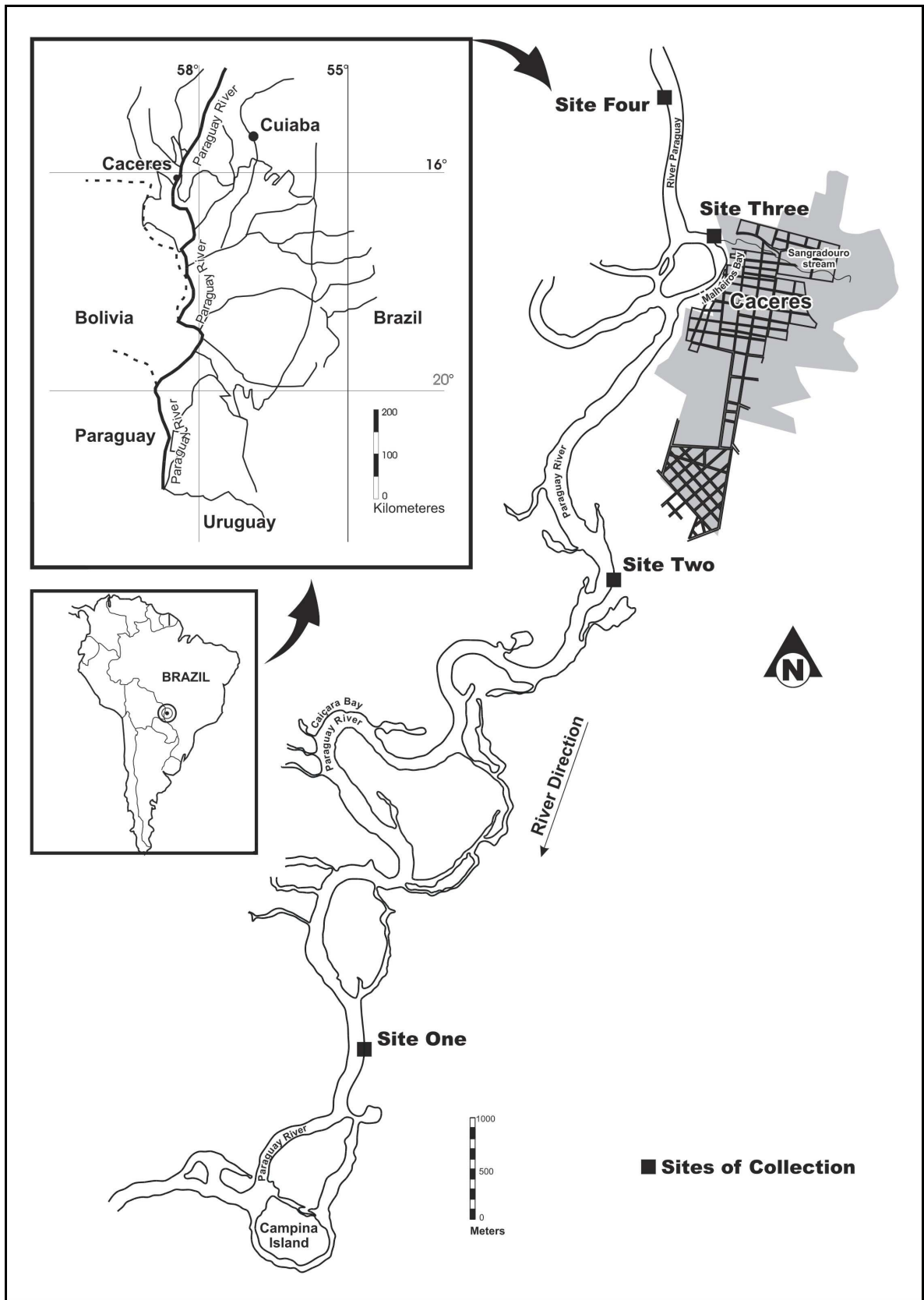


Figure 1 - The localization of Cáceres and the study site.

Table I. Physicochemical analyses conducted during Paraguay River water collection

Collection time and sampling site	River level height* (m)	Water temperature (°C)	pH	Conductivity (µS/cm)	Dissolved oxygen (mg/L)	Turbidity (NTU)
September 2003						
Site 1	1.72 ± 0.01	26.2 ± 0.1	6.92 ± 0.01	150 ± 1	7.36 ± 0.05	
Site 2	1.72 ± 0.01	26.3 ± 0.1	6.85 ± 0.01	143 ± 1	7.24 ± 0.05	
Site 3	1.72 ± 0.01	27.1 ± 0.1	6.82 ± 0.01	440 ± 1	3.66 ± 0.05	
Site 4	1.72 ± 0.01	26.3 ± 0.1	6.90 ± 0.01	36 ± 1	7.18 ± 0.05	
April 2004						
Site 1	3.64 ± 0.01	28.8 ± 0.1	8.25 ± 0.01	46 ± 1	4.60 ± 0.05	16 ± 1
Site 2	3.64 ± 0.01	28.9 ± 0.1	9.00 ± 0.01	44 ± 1	4.44 ± 0.05	15 ± 1
Site 3	3.64 ± 0.01	29.1 ± 0.1	6.70 ± 0.01	176 ± 1	1.42 ± 0.05	20 ± 1
Site 4	3.64 ± 0.01	28.7 ± 0.1	7.30 ± 0.01	46 ± 1	4.98 ± 0.05	15 ± 1
August 2004						
Site 1	1.38 ± 0.01	26.7 ± 0.1	6.25 ± 0.01	180 ± 1	8.04 ± 0.05	25 ± 1
Site 2	1.38 ± 0.01	26.5 ± 0.1	6.15 ± 0.01	35 ± 1	7.70 ± 0.05	12 ± 1
Site 3	1.38 ± 0.01	26.2 ± 0.1	6.74 ± 0.01	441 ± 1	7.12 ± 0.05	21 ± 1
Site 4	1.38 ± 0.01	26.4 ± 0.1	6.13 ± 0.01	26 ± 1	7.75 ± 0.05	13 ± 1
March 2005						
Site 1	3.84 ± 0.01	28.7 ± 0.1	6.07 ± 0.01	32 ± 1	4.35 ± 0.05	14 ± 1
Site 2	3.84 ± 0.01	28.5 ± 0.1	9.29 ± 0.01	32 ± 1	3.84 ± 0.05	16 ± 1
Site 3	3.84 ± 0.01	29.9 ± 0.1	8.70 ± 0.01	74 ± 1	2.67 ± 0.05	22 ± 1
Site 4	3.84 ± 0.01	28.4 ± 0.1	9.70 ± 0.01	30 ± 1	4.24 ± 0.05	17 ± 1

*Data provided by the Brazilian Navy: Fluvial Agency of Cáceres MT – Brazil
NTU Nephelometric Turbidity Units

Table II. Summary of results from chemical analysis of Paraguay River water samples collected in August 2004 and March 2005

Collection time and Site	Sulfur compounds (mg/L)	Floating solids (mg/L) 105°C	Chromium compounds (mg/L)	C.O.D (mg/L)	B.O.D (mg/L)	Oils and greases (mg/L)	Sedimented solids (mg/L)
	* 0.002 mg/L	* virtually absent	* 0.05 mg/L		* ≤ 5 mg/L	virtually absent	* virtually absent
August 2004							
Site 1	92.9 ± 0.1	148 ± 1	0.97 ± 0.01				
Site 2	23.0 ± 0.1	184 ± 1	0.07 ± 0.01				
Site 3	13.6 ± 0.1	152 ± 1	0.09 ± 0.01				
Site 4	<0.1	52 ± 1	0.04 ± 0.01				
March 2005							
Site 1	68.2 ± 0.1	76 ± 1	0.09 ± 0.01	44	25	0.90 ± 0.01	<0.1
Site 2	13.0 ± 0.1	92 ± 1	0.09 ± 0.01	85	47	1.80 ± 0.01	<0.1
Site 3	8.0 ± 0.1	88 ± 1	0.04 ± 0.01	81	46	0.70 ± 0.01	<0.1
Site 4	< 0.1	36 ± 1	0.07 ± 0.01	8	5	0.10 ± 0.01	<0.1

* Limits for the pollutants according to Brazilian legislation [CONAMA, 2005]. C.O.D., Chemical Oxygen Demand; B.O.D., Biochemical Oxygen Demand

Table III Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) after chronic treatment of larvae from ST and HB crosses with superficial waters from the Paraguay River

Crosses and genotypes	Sites of collection	Number of flies (<i>N</i>)	Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a										Total
			Small single spots (1-2 cells) <i>m</i> = 2		Large single spots (>2 cells) <i>m</i> = 5		Twin spots <i>m</i> = 5		Total spots <i>m</i> = 2		<i>Mwh</i> Clones (<i>n</i>)		
ST cross													
September 2003													
<i>mwh/flr</i> ³	Distilled water	30	0.83	(25)	0.07	(02)	0.03	(01)	0.93	(28)		28	
	URE 10 mM.L ⁻¹	30	2.43	(73) +	0.2	(06) i	0.27	(08) +	2.9	(87) +		80	
	Site 1	30	0.73	(22) -	0.13	(04) i	0.07	(02) i	0.93	(28) -		27	
	Site 2	60	0.6	(36) -	0.15	(09) i	0.05	(03) i	0.8	(48) -		46	
	Site 3	30	0.77	(23) -	0.1	(03) i	0.03	(01) i	0.9	(27) -		25	
	Site 4	30	0.53	(16) -	0.07	(02) i	0.03	(01) i	0.63	(19) -		18	
April 2004													
<i>mwh/flr</i> ³	Distilled water	30	0.83	(25)	0.07	(02)	0.03	(01)	0.93	(28)		28	
	URE 10 mM.L ⁻¹	30	2.43	(73) +	0.2	(06) i	0.27	(08) +	2.9	(87) +		80	
	Site 1	30	1.03	(31) i	0.07	(02) i	0.00	(00) i	1.1	(33) -		31	
	Site 2	50	0.98	(49) -	0.08	(04) i	0.04	(02) i	1.1	(55) -		50	
	Site 3	30	0.73	(22) -	0.00	(00) i	0.07	(02) i	0.8	(24) -		24	
	Site 4	30	0.73	(22) -	0.07	(02) i	0.00	(00) i	0.8	(24) -		23	
August 2004													
<i>mwh/flr</i> ³	Distilled water	50	0.66	(33)	0.08	(04)	0.06	(03)	0.8	(40)		40	
	URE 10 mM.L ⁻¹	44	1.82	(80) +	0.18	(08) i	0.14	(06) i	2.14	(94) +		92	
	Site 1	29	2.69	(78) +	0.21	(06) i	0.03	(01) i	2.93	(85) +		84	
	Site 2	40	0.65	(26) -	0.13	(05) i	0.03	(01) i	0.80	(32) -		31	
	Site 3	47	0.85	(40) -	0.06	(03) i	0.00	(00) -	0.91	(43) -		42	
	Site 4	40	0.80	(32) -	0.10	(04) i	0.05	(02) i	0.95	(38) -		37	

(continued on the next page)

Table III (continued)

Crosses and genotypes	Sites of collection	Number of flies (N)	Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a				Total	
			Small single spots (1-2 cells) <i>m</i> = 2	Large single spots (>2 cells) <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots <i>m</i> = 2	<i>Mwh</i> Clones (<i>n</i>)	
<i>mwh/TM3</i>	Distilled water	20	0.40 (08)	0.00 (00)		0.40 (08)		8
	URE 10 mM.L ⁻¹	20	1.05 (21) +	0.10 (02) i		1.15 (23) +		23
	Site 1	25	0.32 (08) i	0.16 (04) i		0.48 (12) i		12
March 2005								
<i>mwh/flr³</i>	Distilled water	50	0.66 (33)	0.08 (04)	0.06 (03)	0.8 (40)		40
	URE 10 mM.L ⁻¹	44	1.82 (80) +	0.18 (08) i	0.14 (06) i	2.14 (94) +		92
	Site 1	50	0.72 (36) -	0.04 (02) i	0.10 (05) i	0.86 (43) -		43
	Site 2	60	1.27 (76) +	0.10 (06) i	0.07 (04) i	1.43 (86) +		82
	Site 3	60	0.83 (50) -	0.05 (03) i	0.05 (03) i	0.93 (56) -		53
	Site 4	40	0.73 (29) -	0.20 (08) i	0.08 (03) i	1.00 (40) -		36
<i>mwh/TM3</i>	Distilled water	20	0.40 (08)	0.00 (00)		0.40 (08)		8
	URE 10 mM.L ⁻¹	20	1.05 (21) +	0.10 (02) i		1.15 (23) +		23
	Site 2	40	0.58 (23) i	0.08 (03) i		0.65 (26) i		26
HB cross September 2003								
<i>mwh/flr³</i>	Distilled water	30	1.4 (42)	0.17 (05)	0.07 (02)	1.63 (49)		51
	URE 10 mM.L ⁻¹	30	12.8 (384) +	2.53 (76) +	2.47 (74) +	17.8 (534) +		486
	Site 1	30	2.60 (78) +	0.47 (14) +	0.20 (06) i	3.27 (98) +		93
	Site 2	30	3.23 (97) +	0.47 (14) +	0.13 (04) i	3.83 (115) +		102
	Site 3	30	2.60 (78) +	0.27 (08) i	0.20 (06) i	3.07 (92) +		91
	Site 4	30	1.80 (54) -	0.20 (06) i	0.13 (04) i	2.13 (64) -		62

(continued on the next page)

Table III (continued)

Crosses and genotypes	Sites of collection	Number of flies (<i>N</i>)	Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a					Total	
			Small single spots (1-2 cells) <i>m</i> = 2	Large single spots (>2 cells) <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots <i>m</i> = 2	<i>Mwh</i> Clones (<i>n</i>)		
<i>mwh/TM3</i>	Distilled water	20	0.55 (11)	0.05 (01)		0.60 (12)		12	
	URE 10 mM.L ⁻¹	20	7.05 (141) +	0.30 (06) i		7.35 (147) +		147	
	Site 1	40	0.58 (23) i	0.05 (02) i		0.63 (25) i		25	
	Site 2	20	0.45 (09) -	0.00 (00) i		0.45 (09) -		9	
	Site 3	20	1.10 (22) +	0.05 (01) i		1.15 (23) +		23	
April 2004 <i>mwh/flr³</i>	Distilled water	30	1.4 (42)	0.17 (05)	0.07 (02)	1.63 (49)		51	
	URE 10 mM.L ⁻¹	30	12.8 (384) +	2.53 (76) +	2.47 (74) +	17.8 (534) +		486	
	Site 1	30	2.73 (82) +	0.17 (05) i	0.07 (02) i	2.97 (89) +		74	
	Site 2	30	2.50 (75) +	0.27 (08) i	0.13 (04) i	2.9 (87) +		81	
	Site 3	30	1.60 (48) -	0.27 (08) i	0.03 (01) i	1.9 (57) -		56	
	Site 4	30	1.43 (43) -	0.13 (04) i	0.10 (03) i	1.67 (50) -		47	
<i>mwh/TM3</i>	Distilled water	20	0.55 (11)	0.05 (01)		0.60 (12)		12	
	URE 10 mM.L ⁻¹	20	7.05 (141) +	0.30 (06) i		7.35 (147) +		147	
	Site 1	40	0.75 (30) i	0.05 (02) i		0.80 (32) i		32	
	Site 2	40	1.08 (43) +	0.05 (02) i		1.13 (45) +		45	

(continued on the next page)

Table III (continued)

Crosses and genotypes	Sites of collection	Number of flies (<i>N</i>)	Spots per fly (no. of spots)/statistical diagnosis ^a								Total <i>Mwh</i> Clones (<i>n</i>)
			Small single spots (1-2 cells) <i>m</i> = 2		Large single spots (>2 cells) <i>m</i> = 5		Twin spots <i>m</i> = 5		Total spots <i>m</i> = 2		
August 2004											
<i>mwh/flr</i> ³	Distilled water	50	1.86	(93)	0.08	(04)	0.02	(01)	1.96	(98)	98
	URE 10 mM.L ⁻¹	50	7.68	(384) +	1.52	(76) +	0.7	(35) +	9.9	(495) +	480
	Site 1	31	3.03	(94) +	0.32	(10) +	0.10	(03) i	3.45	(107) +	103
	Site 2	35	1.71	(60) -	0.20	(07) i	0.06	(02) i	1.97	(69) -	72
	Site 3	40	4.10	(164) +	0.23	(09) i	0.15	(06) +	4.48	(179) +	164
	Site 4	31	1.29	(40) -	0.10	(03) i	0.00	(00) i	1.39	(43) -	42
<i>mwh/TM3</i>	Distilled water	20	0.65	(13)	0.05	(01)			0.70	(14)	14
	URE 10 mM.L ⁻¹	20	4.95	(99) +	0.25	(05) i			5.20	(104) +	104
	Site 1	40	0.70	(28) i	0.00	(00) i			0.70	(28) -	28
	Site 3	40	0.83	(33) i	0.08	(03) i			0.90	(36) i	36
March 2005											
<i>mwh/flr</i> ³	Distilled water	50	1.86	(93)	0.08	(04)	0.02	(01)	1.96	(98)	98
	URE 10 mM.L ⁻¹	50	7.68	(384) +	1.52	(76) +	0.7	(35) +	9.9	(495) +	480
	Site 1	49	3.57	(175) +	0.08	(04) i	0.06	(03) i	3.71	(182) +	181
	Site 2	40	2.68	(107) -	0.15	(06) i	0.03	(01) i	2.85	(114) -	108
	Site 3	40	3.33	(133) -	0.23	(09) i	0.05	(02) i	3.60	(144) -	129
	Site 4	40	1.65	(66) -	0.10	(04) i	0.05	(02) i	1.80	(72) -	68
<i>mwh/TM3</i>	Distilled water	20	0.65	(13)	0.05	(01)			0.70	(14)	14
	URE 10 mM.L ⁻¹	20	4.95	(99) +	0.25	(05) i			5.20	(104) +	104
	Site 1	40	0.68	(27) -	0.05	(02) i			0.73	(29) -	29

^a Statistical diagnosis according to Frei and Würzler. +: Positive; - negative; i: inconclusive; m: multiplicate factor; probability levels: $\alpha = \beta = 0,05$. URE, urethane; MH, marker-heterozygous; BH, balancer-heterozygous.

**Evaluation of the quality of water of Paraguay River, Cáceres - MT, Brazil,
using the Micronucleus Test on Fish (MNTF) and chemical analyses**

**Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta^{1,2}, Júlio César Nepomuceno², and
Luiz Alfredo Pavanin³**

**¹ Institute of Natural and Technological Sciences, UNEMAT – Mato Grosso
State University at Cáceres, MT, Brazil**

**² Institute of Genetics and Biochemistry, UFU – Federal University of
Uberlândia at Umuarama, Uberlândia, MG, Brazil**

**³ Institute of Chemistry, UFU – Federal University of Uberlândia at Santa
Monica, Uberlândia, MG, Brazil**

**Corresponding author: Júlio César Nepomuceno, Universidade Federal de
Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese.
Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brasil
E-mail: nepomuceno@ufu.br Phone: +55 (34) 32182505; Fax: +55 (34)
32182203**

ABSTRACT

The quality of the water of the Paraguay River where it flows through the town of Cáceres, situated on the left margin of the river 210 km from Cuiabá, the capital of the state of Mato Grosso, Brazil, was evaluated based on the Micronucleus Test in Fish (MNTF) and chemical analyses. The main tributary of the Upper Paraguay Basin, the Paraguay River originates in the Planalto dos Parecis highlands in Mato Grosso and flows southeast through the Pantanal wetlands. The water in the stretch of the river under study is affected directly or indirectly by various anthropogenic actions. In April and August 2004, in the rainy and dry seasons, respectively, peripheral blood samples were collected from fish collected at testing sites receiving: 1) upstream of the urban perimeter, used as reference. 2) the Sangradouro Stream (urban perimeter, sanitary sewage); 3) tannery discharge (from a large plant); Site 3 was downstream of the urban perimeter. *Pimelodus maculatus* (mandi) were collected at testing sites 1, 2, and 3 in both rainy and dry seasons, while *Leporinus friderici* (piauí) was collected in the dry season only in testing sites 1 and 3. The river water and sediments were analyzed to determine sulfides, suspended solids, chromium (Cr), oils and fats, biochemical demand of oxygen, chemical demand of oxygen and sedimented solids. The results indicated that all the sites contained Cr, and that the sulfide content at sites 2 and 3, oils and greases exceeded the legal limit. The data showed a statistically significant increase in micronucleus (MN) frequencies in *P. maculatus* red blood cells at sites 2 and 3 compared with site 1, as well as statistically significant increases in the MN frequencies in *L. friderici* red blood cells at site 3 compared with site 1. Therefore, the results indicated significant increases

in the rainy and dry season, demonstrating that the waters of the Paraguay River, as they flow through Cáceres, receive genotoxic effluents which may be associated with the presence of heavy metals (Cr), sulfates (S), oils or grease other chemical substances.

Keywords: sulfates, oils and grease; Chromium; Paraguay River; Aquatic Environments;

INTRODUCTION

The extensive industrial development and urbanization along river and ocean shores have led to the discharge of large quantities of various biologically active substances into the water, including thousands of organic, inorganic and xenobiotic chemical compounds (Bresler et al., 1999). Pollution has therefore become the major concern in urban areas. Due to its biological significance, the genotoxicity of these substances has been the main focus of pollution assessments, particularly in view of the increasing complexity of the chemical environments to which organisms are exposed (Prá et al., 2005).

The origin of ecotoxicological activity in the environment is related to industrial effluents, domestic sewage, and contamination by agrochemicals or even potentially reactive natural products (Vargas et al., 2001). Aquatic ecosystems, including streams, rivers, lakes, and estuaries, have been the target of increasingly intensive anthropogenic actions. Aquatic organisms are subjected to varying and numerous stressors induced naturally and by humans, which act spatially and temporally (Adams & Greeley, 2000).

Thus, the aquatic environment has served as a deposit of different types of anthropogenic discharges, leading to increasing xenobiotic contamination produced by complex and unknown mixtures (Lemos & Erdtmann, 2000). Watercourses are often used for transporting wastes away from where they are produced and discharged. Unfortunately, these wastes are frequently toxic and their presence can seriously degrade the habitats of rivers, lakes, ports or streams (White & Rasmussen, 1998). In natural ecosystems, xenobiotic stresses cause diseases in selected biota, hereditary lethality, and often lead to the extinction of more sensitive organisms and the predominance of stronger ones, such as various species of algae and bacteria (Bresler et al., 1999). Environmental contamination can affect biological systems and can cause genetic damage (Bickham et al., 2000). Xenobiotics stress of natural ecosystems cause damage in selected biota, increasing lethality, can resulting in the extinsion of more sensible organism and the doming of the more resistant and some opportunistic organisms (Bresler et al., 1999).

Many animal species can be used as bioindicators to test the effect of various chemical substances on laboratory lines and strains, or to evaluate natural populations in investigations of the presence of pollutants in an ecosystem (Cristaldi et al., 2004). Fishes are a suitable model widely used as a bioindicator of genotoxicants in the aquatic medium (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996, Grisolia & Starling, 2001), due to their ability to metabolize xenobiotics and accumulate contaminants (Grisolia & Cordeiro, 2000). Peripheral blood samples are suitable and sufficient for biomonitoring projects, for they allow several samples to be collected from the same individual without requiring the animal to be killed (Nepomuceno et al. 1997, Palhares & Grisolia, 2002).

Among the various techniques for detecting genetic and genotoxic effects in fish, the Micronucleus Test on Fish (MNTF) is often used, since it is relatively easy to adapt to different species (Çavas & Ergene-Gözükara, 2005a). The MNTF is a powerful *in situ* biomonitoring tool for detecting genotoxic agents and is applicable to freshwater and saltwater fish (Hayashi et al., 1998), so it is widely used for monitoring genotoxic compounds in fresh and saltwater ecosystems (Grisolia et al., 2005). Although nuclear abnormalities are usually indicators of genotoxicity in fish and may complement the MN count in genotoxicity studies (Ayllón et al., 2000; Çavas & Ergene-Gözükara, 2005a).

Like all riverside towns, the tourist town of Cáceres, located on the left margin of the Paraguay River in the southwest of the state of Mato Grosso (Brazil) shows environmental imbalances resulting from human actions. These include the discharge of sanitary (domestic) sewage and agro-industrial effluents (cold storage plant, dairy plant and tannery wastes), impacts caused by tourism, by the Paraguay-Paraná waterway, and by the International Fishing Festival (FIP), the world's biggest annual freshwater fishing championship, all of which have led to environmental impacts directly affecting the quality of life of the population.

The Paraguay River is the principal tributary of the Upper Paraguay Basin (Assine & Soares, 2004). It flows along the western side of the Pantanal wetlands, collecting water from several tributaries and also diffuse contributions from the floodplain (Hamilton et al., 1997). The Paraguay River begins in the region of the Planalto Parecis highlands, the great divide between the Amazon basin and the Platina basin in the state of Mato Grosso, draining the lowlands and plains of the Pantanal of Mato Grosso towards Paraguay and Argentina. Along its route, the Paraguay River drains a variety of environments and vegetal formations,

developing into a region marked by a great wealth and diversity of flora and fauna. The Upper Paraguay Basin is of extreme strategic importance in the management of the water resources of Brazil, Bolivia and Paraguay, which share it. This basin includes the Pantanal wetlands, one of the largest floodplains of the planet, encompassing an area of 147,574 square kilometers and linking Brazil's Cerrado to the Chaco regions of Bolivia and Paraguay (FEMA, 2003).

In view of the above, the purpose of this study was to evaluate the quality of the waters of the Paraguay River in the dry and rainy seasons, at the point where the flows through the town of Cáceres, using the MNTF method on the species *Pimelodus maculatus* and *Leporinus friderici*, as well as chemical analyses of river water and sediments.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Selected testing sites and periods

Cáceres is a town situated in the state of Mato Grosso, 210 km from the state's capital, Cuiabá, on the left margin of the Paraguay River, at 16°11'42" latitude south and 57°40'51' longitude west (www.caceres.mt.gov.br).

The water and sediment samples were collected in April and August 2004, which correspond to the rainy and dry seasons, respectively. The sampling sites were selected based on the apparent levels of most critical pollution (Çavas & Ergene-Gözükara, 2005a). These were sites where effluents were released into the river from: site 1) which served as reference, located upstream from the urban perimeter and 1,200 meters upstream from site 2; site 2) the Sangradouro Stream,

which receives effluents from urban sewage and all sorts of urban wastes, and flows into Malheiros Bay, within the urban perimeter, whose geographic coordinates are 16° 03' 40.9" S, 57° 41' 19.7" W; and lastly; 3) a large tannery located 11,500 meters downstream from site two, site Sites 3 was downstream from the urban perimeter. Figure 1 illustrates the location of the sampling sites in relation to the town of Cáceres, MT.

Physicochemical data collected *in loco* in each sample collection

The data collected were the river's water level, pH, temperature, dissolved oxygen, electrical conductivity and turbidity in the two sampling periods at the four selected sites.

Specimens: collections, slide preparation and analyses

The following species were chosen for accomplishment of that study: 1) *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae), known as Mandi (bagre), which presenting wide geographical distribution, being restricted to the fluvial systems of South America and feeding onívora. In that species, the effects of some metal ions in blood and liver was verified (Rodrigues et al., 1989). *P. maculatus* has been used as bioindicador answering the alterations in the water quality. The enzymes of oxidative stress, the activity of Na⁺K⁺ATPase branchial, morphological aspects of red and white blood cells were analyzed (Sakuragui et al., 2007). 2) *Leporinus friderici* (Anostomidae), known as Piau, also was restricted South America, thoroughly distributed in this area, it presents alimentary plasticity. This species was used as bioindicador of mercury accumulation (Dorea et al., 2006).

The two species were collected at the same time. 25 exemplary of *Pimelodus maculatus* was collected in the rainy season; 31 in the dry season in the three sites. The animal's size varied among 20 ± 5 cm. Fifteen individuals of *Leporinus friderici* were also collected in the drought period in two sites. The size of these fish varied among 26 ± 5 cm. A total of 288.000 red blood cells were analyzed in 71 animals.

In order to standardize the conditions of the samples for analysis of the *in loco* physicochemical characteristics, water and sediment samples and fish specimens were all collected in one day during the rainy season and one day in the dry season. For this reason, it was difficult to catch specimens of the two fish species at all the sampling sites, which resulted in a reduced sample lot.

The fish were caught within a radius of 20 meters from the central point of each testing sites, using the traditional hook and line fishing method. Peripheral blood was drawn from the brachial artery, as described by Nepomuceno et al. (1997), using an individual sterile needle and syringe (insulin-type) previously heparinized with liquemine on each animal (heparin sodium, 25000 U.I./ 5 mL, Roche – Basel - Switzerland). Blood smears were prepared immediately and air dried for 24 hours (Grisolia & Starling, 2001). The blood cells were then fixed with absolute methanol for 10 min, stained with a 1:20 solution of Giemsa stain and phosphate buffer (pH 6.8) for 10 min, then washed in distilled water and air dried. Four slides were prepared for each animal.

Using light microscopy (1,000 x magnification, 4,000 red blood cells per animal were analyzed as described by Schmidt (1975). We chose to record only micronuclei (MN) and binucleate cells (BC). Binucleate cells were those that had

two nuclei of the same size and color (Ayllón et al., 2000; Çavas & Ergene-Gözükara, 2005a). The criteria for identifying micronucleate fish red blood cells were the nuclear particles, which should be smaller or the same size (which was observed in very low number) and completely separate from the principal nucleus, nonrefractory, with the same shape, color and intensity of the cell's nucleus, and be inside the cell's cytoplasm. The frequencies of micronucleate and binucleate cells were computed jointly.

Chemical analyses

Water and sediments were collected from the four study sites. The water samples were acidified and cooled, and the sediment samples were frozen. The chemical analyses were carried out in the Chemistry Laboratory of the Institute of Chemistry at UFU, Uberlândia, MG, Brazil.

Statistical analysis

The frequencies of micronuclei expressed in the erythrocytes of *P. maculatus* and *L. friderici* from sites 2 and 3 were compared with those from site 1 (reference) by the nonparametric Mann-Whitney U-test at significance levels of $\alpha = 0.05$.

RESULTS

All the parameters of the physicochemical characteristics *in loco* showed variations from one sampling site to another in the same sampling period, each site showing its specific characteristics except for temperature, which varied only minimally from one site to another. From one collection period to the other, all the

sites showed variations in water level, pH, electrical conductivity and turbidity. Dissolved oxygen values were unvaried only in the rainy season (April), when the values at all the sampling sites were very similar, as indicated in Table I.

The results of the chemical analyses of the water and sediments of each site are demonstrated in the Table II. Chromium (Cr) was detected in waters and sediments of all the sites, include site 1, which was used as reference site. At rainy season Chromium was detected only in the sediment of the site 3. Sulfates were also detected in waters of site 2 and 3. All samples of sediments collected in site 3 showed sulfates. Oil and greases also were detected in sediments of all sites, with exception of sample collected in the rainy season in the site 3.

Table III shows the results of the MNTP. Note that the frequency of MN in *P. maculatus* red blood cells was significantly higher at sites 2 and 3 when compared with site 1, in both the rainy and dry seasons ($P < 0.01$). There was also a statistically significant increase in the induction of MN of *L. friderici* collected at site 3 when compared with the individuals collected at site 1 ($P < 0.01$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

According Brazilian legislation (CONAMA, 2005), waters of river of class 2, as it is the case of Rio Paraguay, it is allowed values of dissolved oxygen ≥ 5 mg/L; sulfate (S) $\leq 0,002$ mg/L; chromium (Cr) $\leq 0,05$ mg/L and oils and greases must be virtually absent.

The *in loco* physicochemical characteristics (Table I) and chemical analyses (Table II) showed significant differences between the rainy and dry seasons.

Ecosystems subject to high levels of pollution are usually exposed to other kinds of anthropic-related damage such as fluctuations in water flow, thermal oscillations, high levels of suspended matter in water, and low oxygenation (Sánchez-Galán et al., 1998). All the data showed in the table I obey Brazilian legislation, except the dissolved oxygen, whose values are below, especially in the period of full (April). The table II showed that amount found of sulfate, chromium, oils and greases were out of the allowed by the Brazilian legislation. The effluents received by river Paraguay alter the quality of this ecosystem.

The frequency of micronuclei in fish is usually higher in the warmer season, especially in summer (Çavas & Ergene-Gözükar, 2005b). Hence, it is also possible that the increase in micronuclei frequency revealed in the present study was due to seasonal differences (rainy and dry seasons), as proposed by Hayashi et al. (1998) and Çavas & Ergene-Gözükar (2005a). One of the most important seasonal factors that can affect MN frequency is water temperature, because fish are polythermic (cold-blooded) and their metabolism is highly dependent on the environmental temperature. In this study, a comparison of the MN frequencies induced in *P. maculatus* collected at sites 1, 2 and 3 in the rainy (autumn) and dry (winter) seasons revealed seasonal differences (Table III). Statistically, the frequencies were higher in the dry season, probably because the pollutants are more concentrated, as well as other factors, as reported by Çavas and Ergene-Gözükar (2005b).

According to Seigneur & Constantinou (1995), Cr toxicity depends on its state of oxidation when it is discharged into the effluent. Cr (III) and Cr (VI) are commonly found in the environment, and oxidation of Cr (III) into Cr (VI) and vice-versa can occur naturally in aqueous environments, but the hexavalent form is

usually concentration smaller. Cr (II) is very unstable and oxidizes rapidly into Cr (III), while elemental Cr (O) also oxidizes into Cr (III). Tannery effluents contain predominantly Cr (III) compounds, which, depending on some of the parameters of the receiving water body, are believed to favor the oxidation of Cr (III) to Cr (VI). Therefore, one cannot discard the possibility that discharges containing Cr (III) ions, albeit not very harmful, may induce toxic effects when present in high concentrations.

The increase in the induction level of MN in erythrocytes by Cr (III) is determined by the concentration of the dose and the duration of exposure (Al-Sabti et al., 1994). According to Çavas and Ergene-Gözükara (2005b), the slow absorption of Cr (III) found in effluent has caused significant increases in genetic alterations only at high concentrations and long duration exposure. In contrast, in the studies of Graf et al. (1992), Cr (III) chloride did not show toxicity by the *Drosophila* wing spot test (SMART). This contradiction was probably due to the fact that the SMART is a short duration test, so the period of exposure was short. Therefore, it is possible that the Cr detected in our chemical analysis of site 1 was Cr (III), since in other studies conducted by the same authors of this research (data not yet published), the Cr found in the water at site 1 did not induce genotoxicity in *Drosophila melanogaster* wings by the SMART test, in line with the report of Graf et al. (1992).

However, genotoxic effects of Cr (VI) and (III) were found in *Carassius auratus gibelio* erythrocytes by the micronucleus test (Al-Sabti et al., 1994). Cr is potentially able to induce chromosome breakdown (clastogenic effect) and chromosome loss (aneugenic effect), resulting in chromosome aberrations, formation of micronuclei and binucleate cells (Matsumoto et al., 2006). Cr (VI) is

highly toxic in redfish hepatocytes (Krumschnabel & Nawaz, 2004), carcinogenic in fish (Çavas & Ergene-Gözükar, 2005b), and a powerful carcinogen in human lung cells (Wise et al., 2004), and is also cytotoxic and genotoxic for the epithelial cells of human lungs (Wise et al., 2006). Using the *Drosophila* wing spot test, Graf et al. (1992) demonstrated that Cr VI) oxide is highly genotoxic in chronic and acute treatments, and that more than 90% of the spots induced were due to mitotic recombinogenic events.

Sulfides were also detected at sites 2 and 3: sulfur dioxide (SO₂) and its hydrates bisulfite (HSO₃⁻) and sulfite (SO₃⁻²) demonstrated to be genotoxic in lymphocytes human and other mammals. Bisulfite is a genotoxic agent in DNA molecules in animal and plant cells (Yi & Meng, 2003). Sulfur dioxide (SO₂) derivatives, such as sodium sulfite-bisulfite mixtures, have been reported to induce genotoxic activity in rats through systemic toxic action (Meng et al., 2004). Sodium metabisulfite (SMB) has been found to induce chromosome aberrations (chromatid and chromosome breakdown), and dose-dependent sister chromatid exchange in human lymphocytes in all the concentrations studied (Rencüzogullari et al., 2001).

Vehicles with motors using diesel or gasoline are also sources of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) (Oros and Ross, 2004; Sharma et al., 2007). The toxicity petrochemic chronic is associated with fractions of gasoline (WSF) soluble in water (Paixão et al., in press), generally is attributed to the presence of monoaromatic PAHs (Durako et al., 1993; Masten et al., 1994; Baird, 2002; Paixão et al., in press). Nitrogen compounds also contribute to the mutagenic activity of PAHs (Vargas et al., 1998). PAHs represent a promutagenic class of compounds (Frölich and Würzler, 1990; Missini et al., 1998). They can increase the proliferate rate and the probability of fixation of mutations (Andrysík et al., 2007), potent

carcinogenic in several animal species, including human cells (Boland et al., 1998; Delgado-Rodriguez et al., 1995; Kuljukka-Rabb et al., 2001; Zhao et al., 2003). The influence of oils and greases on the genotoxicity observed in should be considered (table II).

Thus, the genotoxicity detected in the present study may have been induced by Cr and/or sulfides an/or oils and greases (Table II), or even by other compounds not analyzed in the river water.

Fluvial waters, industrial effluents and superficial water are complex mixtures (Reifferscheid and Grummt, 2000; Lima et al., 2007; Minissi et al., 1996), since its are constituted of thousands of individual components. Those compounds can interact in an addictive, synergistic or antagonistic way (Lemos & Erdtmann, 2000; Vargas et al., 2001; Fent, 2003; Horn et al., 2004). However there is no understanding of how those toxicant compositions they can interact to each other, nor how they can interact with other components of the effluents (White, 2002; Fent, 2003; Hewitt and Marvin, 2005), which makes their chemical determination difficult. Hence, forecasting toxicity based on the chemical analysis of isolated substances may provide imprecise data about the genotoxic effect of complex mixtures on live organisms (Vargas et al., 2001). Also, it is very difficult to pinpoint specific chemical substances as a genotoxic response in environmental samples because few of the components are present in high concentrations (Stahl, 1991). Therefore, the cause of genetic damage cannot be attributed to a specifc agent, due to the constitution of complex mixtures (Donbak et al., 2005).

Different fish species may respond to a given genotoxic agent in very distinct ways. Depending on the toxic agent and the species, MN rates may exhibit significant variations, which are probably related to the pharmacokinetics of the

drugs employed and the speed of the hematopoietic cycle (Palhares & Grisolia, 2002). Fishes have different degrees of sensitivity to micronuclei induction, and some species can act as more sensitive sentinels than others in the evaluation of genotoxic contaminants (Pantaleão et al., 2006). A comparison of the MN rates induced in the erythrocytes of *P. maculatus* at sites 3 and 1 in the dry season and those of *L. friderici* in the same period revealed higher rates in the former, demonstrating the greater sensitivity of *P. maculatus* (Table III).

This study's evaluation of the waters of the Paraguay River in the portion flowing through the town of Cáceres is based on the application of the MNTF, allied to the chemical analysis of several parameters selected according to the possible types of effluents. It is therefore coherent with the proposals of some authors (Reifferscheid & Grummt, 2000) who discuss the importance of risk evaluation of the effects of potent genotoxins that make up complex mixtures, through biotest systems using cells or live organisms allied to chemical analyses.

Because sites 1, and 2 are upstream from site 3 (tannery), and therefore upstream from the main source of Cr pollution, it is suggested that other studies be carried out to discover the existing sources of Cr; and to identify the possible sources of sulfides found at sites 2 and 3. It is important to be consider that the effluents, independent of being of agreement with the legal legislation, it can degrade the biological interrelations (Buss et al., 2003).

We conclude that the MNTF was effective in the *in situ* evaluation of the waters of the Paraguay River at Cáceres. The species *Pimelodus maculatus* and *Leporinus friderici* proved to be good bioindicators of genotoxicity, although *P. maculatus* showed greater sensitivity, indicating that these waters receive genotoxic effluents and that site 3 is the most critical, followed by site 2.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Mato Grosso State University (UNEMAT/ICNT) at Cáceres and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for their financial support, and the Federal University of Uberlândia for hosting this project. We are indebted to Dr. Francisco Langeani, of UNESP's Department of Zoology and Botany at São José do Rio Preto, for his identification of the species *Leporinus friderici* (Bloch, 1794).

REFERENCES

- Adams SM, Greeley MS. 2000. Exotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. J. of Water, Air, and Soil Pollution 123: 103-115.
- Al-Sabti K, Franko M, Andrijanic B, Knez S, Stegnar P. 1994. Chromium-induced micronuclei in fish. Journal of applied toxicology 14: 333-336.
- Al-Sabti K, Metcalfe CD. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research 343: 121–135.
- Andrysík Z, Vondráček J, Machala M, Krčmář P, Švihálková-Šindlerová L, Kranz A, Weiss C, Faust D, Kozubík A, Dietrich C (2007) The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic

- aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells. *Mutation Research* 615(1-2): 87-97.
- Ayllón F, Suciú R, Gephart S, Juanes F, García-Vázquez E. 2000. Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*. *Mutation Research* 470: 69–176.
- Assine ML, Soares PC. 2004. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International* 114: 23–34.
- Baird C. 2002. Química Ambiental/Colin Baird; trad. Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera, second ed. Bookman, Porto Alegre.
- Bickham JW, Sandhu S, Hebert PDN, Chikhi L, Athwal R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463: 33-51.
- Boland S, Baeza A, Fournier T, Aubier M, Marano F. 1998. Effects of diesel exhaust particles on human airway epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters* 95(Supplement 1): 224-225.
- Bresler V, Bissinger V, Abelson A, Dizer H, Sturm A, Kratke R, Fishelson L, Hansen PD. 1999. *Marine molluscs* and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgoland Marine Research* 53: 219–243.

Buss DF, Baptista DF; Nessimian JL. 2003. Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water quality programs. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19(2): 465-473.

Çavas T, Ergene-Gözükara S, 2005a. Micronucleus Test in Fish Cells: A Bioassay for In Situ Monitoring of Genotoxic Pollution in the Marine Environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 46: 64-70.

Çavas T, Ergene-Gözükara S. 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74(3): 264–271.

Cristaldi M, Ieradi LA, Udriou I, Zilli R. 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutation Research* 559: 1–9.

Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Martelo R, Graf U, Villalobos-Pietrini R, Gómez-Arroyo S. 1995. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 341: 235-247.

CONAMA, 2005 - Resolução Nº 357 de 17/03/2005 do Conselho Nacional de meio Ambiente. MMA. Brasil.

Donbak L, Rencüzogulları L, Yavuz A, Topaktas M. 2005. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutation Research* 588: 82–87.

Dorea JG, Antonio C. Barbosa AC, Silva GS. 2006. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142(3-4): 275-283.

Durako MJ, Venwosthu WJ, Fatemy SMR, Valavi H, Thayer GW .1993. Assessment of the toxicity of Kuwait crude oil on the photosynthesis and respiration of sea grasses of the northern gulf. *Marine Pollution Bulletin* 27: 123–227.

FEMA, 2003. Projeto Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado De Bacia Hidrográfica Para O Pantanal E Bacia Do Alto Paraguai - Agencia Nacional das Águas/Fundo para o Meio Ambiente Mundial/Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente/Organização dos Estados Americanos. Resumo Executivo do Relatório Final. Disponível em www.ana.gov.br/gefap - Componente III, acesso em 20/07/2006.

Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140-141: 353-365.

Frölich A, Würgler FE. 1990. Drosophila wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation*

Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects . 234 (2): 71-80.

Graf U, Heo OS, Ramirez OO. 1992. The genotoxicity of chromium(VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. Mutation research 266(2): 197-203.

Grisolia CK, Cordeiro CMT. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. Genetics and Molecular Biology 23(1): 235-239.

Grisolia CK, Starling FLR. 2001. Micronuclei monitoring of fish from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutation Research 491: 39-44.

Grisolia CK, Oliveira ABBO, Bonfim H, Klautau-Guimarães MN. 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and Molecular Biology 28(2): 334-338.

Hamilton SK, Sippel SJ, Calheiros DF, Melak JM. 1997. Na anoxic event and other biogeochemical effects of the Pantanal wetland on the Paraguay River. Limnology. Oceanography 42(2): 257-272.

Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinai N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano, N, Sofuni T, Ojima Y. 1998. Development of genotoxicity

assay systems that use aquatic Organisms. *Mutation Research* 399: 125–133.

Hewitt LM, Marvin H. 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutation Research* 589: 208–232.

Horn RC, Rocha JA, Vargas VM. 2004. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis* 19(6): 445-51.

Kuljukka-Rabb T, Peltonen K, Isotalo S, Mikkonen S, Rantanen L, Savela K. 2001. Time- and dose-dependent DNA binding of PAHs derived from diesel particle extracts, benzo[a]pyrene and 5-methylchrysene in a human mammary carcinoma cell line (MCF-7). *Mutagenesis* 16 (4): 353-358.

Krumschnabel G, Nawaz M. 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 70: 159–167.

Lemos CT, Erdtmann B. 2000. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutation Research* 467: 1–9.

Lima ROA, Bazo AP, Salvadori DMF, Rech CM, Oliveira DP, Umbuzeiro GA. 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing

plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research* 626: 53–60.

Masten LW, Boeri RL, Walker JD. 1994. Strategies employed to determine the acute aquatic toxicity of ethyl benzene, a highly volatile, poorly water-soluble chemical. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 27: 335–348.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 148-158.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Bai J. 2004. DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 19(6): 465—468.

Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M. 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation Research* 367: 245–251.

Minissi S, Caccese D, Passafiume F, Grella A, Ciccotti E, Rizzoni M. 1998. Mutagenicity_micronucleus test in *Vicia faba* root tips/, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber

River and its tributaries within the urban area of Rome. Mutation Research 420: 77–84.

Nepomuceno JC, Ferrari I, Spanó MA, Centeno AJ. 1997. Detection of Micronuclei in Peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. Environmental and Molecular Mutagenesis 30: 293-297.

Oros DR, Ross JRM. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Estuary sediments. Marine Chemistry 86(3-4): 169-184.

Paixão JF, Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBL, Carvalho GC, Severiano J, Rebouças M, Matias GRA, Rodrigues ILP (2007) Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. Environmental Research- article in press – www.sciencedirect.com (visitado em 05/01/2007).

Palhares D, Grisolia CG. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. Genetics and Molecular Biology 25(3): 281-284.

Pantaleão SM, Alcântara AV, Alves JPH, Spanó MA. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba River in Brazil. Environmental and Molecular Mutagenesis 47(3): 219–224.

- Prá D, Lau AH, Knakiewicz T, Carneiro FR, Erdtmann B. 2005. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research* 585(1-2): 79-85.
- Reifferscheid G, Grummt T, 2000. Genotoxicity in German surface waters - results of a collaborative study. *Water, Air, and Soil Pollution* 123: 67–79.
- Rencüzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktas M. 2001. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutation Research* 490: 107–112.
- Rodriguez AL, Bellinaso ML, Dick T. 1989. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinate dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 94(1): 65-69.
- Sánchez-Galán S, Linde AR, Izquierdo JI, García-Vázquez E. 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Research* 412: 219-225.
- Sakuragui MM, Paulino MG, Henrique HS, Fernandes MN. 2007. 16.P13. Na⁺/K⁺-ATPase activity in the fish gills of *Pimelodus maculatus*. *Comparative*

Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology
148(1): S73.

Sharma H, Jain VK, Khan ZH. 2007. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. Chemosphere 66: 302–310.

Stahl RGJr. 1991. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewater. Ecotoxicology and environmental Safety 22:94-125.

Seigneur C, Constantinou E. 1995. Chemical Kinetic Mechanism for Atmospheric Chromium. Environmental Science and Technology 29: 222-231.

Schmid W. 1975. Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis in: Hollanender A. Chemical Mutagens. Principles and Methods for Their Detection. Plenum Press, New York and London 4(36): 31-53.

Vargas VMF, Horn RC, Guidobono RR, Mittelstaedt AB, Azevedo IG. 1998. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. Genetics and Molecular Biology 21(2): 247-253.

Vargas VMF, Ducatti A, Horn RC. 2001. Diagnóstico de mutagênese ambiental e sua aplicabilidade em ecotoxicologia. In Tucci, CEM. and Marques, DML.M. (eds), Avaliação e controle da Drenagem Urbana. ABRH, Porto Alegre, vol. 2, p. 548.

- Zhao X, Wan Z, Zhu H, Chen R. 2003. The carcinogenic potential of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 540(1): 107-117.
- Wise SS, Holmes AL, Ketterer ME, Hartsock WJ, Fomchenko E, Katsifis S, Thompson WD, Wise JP. 2004. Chromium is the proximate clastogenic species for lead chromate-induced clastogenicity in human bronchial cells. *Mutation Research* 560: 79–89.
- Wise SS, Holmes AL, Wise JP. 2006. Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 610(1-2): 2-7.
- Yi H, Meng Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutation Research* 537: 109–114.
- White PA, Rasmussen JB. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research* 410: 223–236.
- White PA. 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research* 515: 85–98.

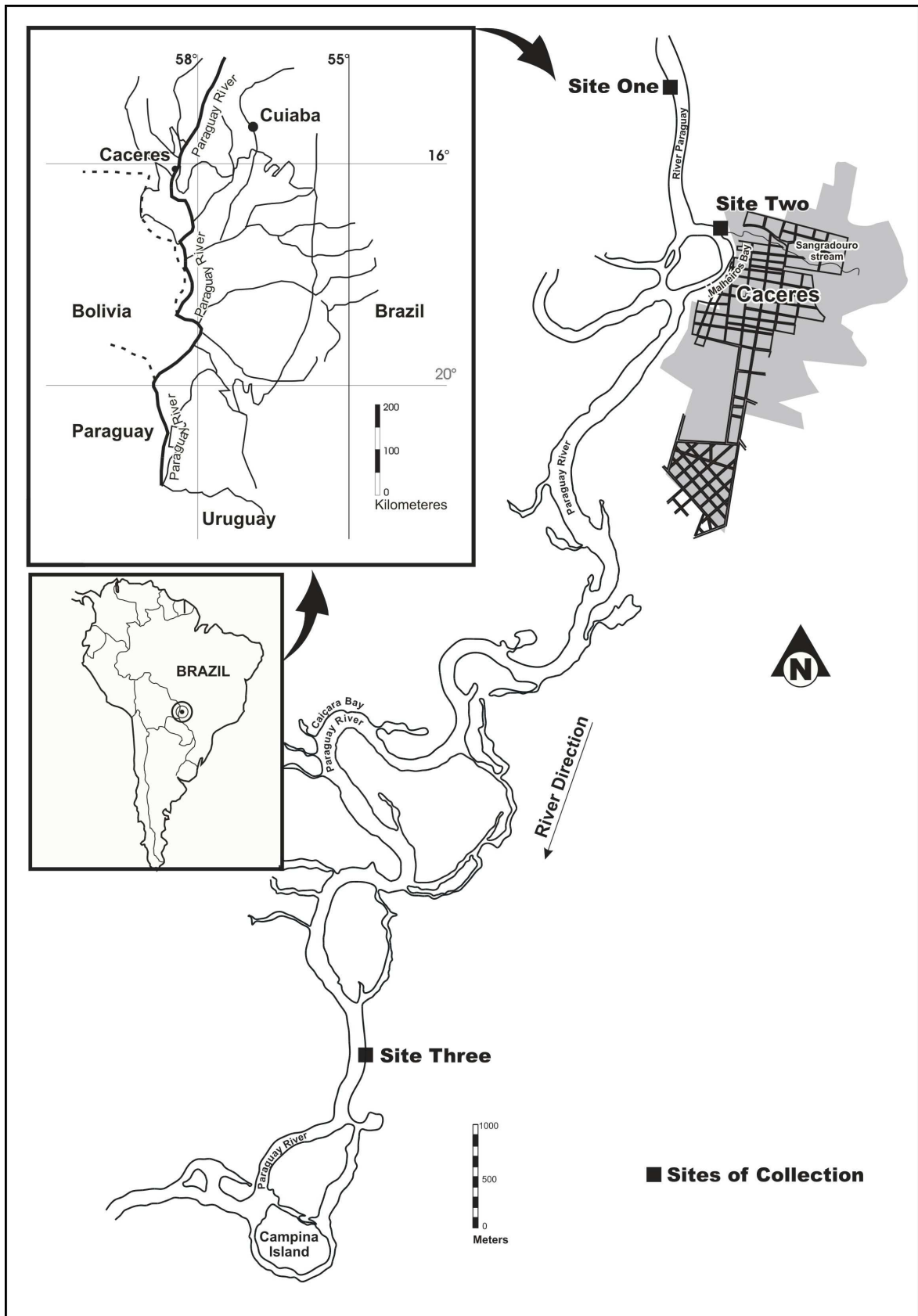


Figure 1 – The localization of Cáceres and the study site.

Table I. Physicochemical analyses conducted during Paraguay River water collection

Collection time and sampling site	River level height* (m)	Temperature water (°C)	pH	Conductivity (µS/cm)	Dissolved oxygen (mg/L)	Turbidity (NTU)
April 2004						
Site 1	3.64	28.7	7.30	46	4.98	15
Site 2	3.64	29.1	6.70	176	1.42	20
Site 3	3.64	28.8	8.25	46	4.60	16
August 2004						
Site 1	1.38	26.4	6.13	26	7.75	13
Site 2	1.38	26.2	6.74	441	7.12	21
Site 3	1.38	26.7	6.25	180	8.04	25

*Data provided by the Brazilian Navy Fluvial Agency of Cáceres (MT) – Brazil
NTU – Nephelometric Turbidity units

Table II. Chemical analyses of water and sediments from the four studied sites

Parameters analyzed	Site 1	Site 2	Site 3
August 2004 (water)			
Sulfides (mg/L)	Nd	13.6	92.9
Suspended solids (mg/L) 105°C	52	152	148
Chromium (mg/L)	0.04	0.09	0.97
April 2004 (sediment)			
Sulfides (ppm)	Nd	Nd	31.42
Chromium (ppm)	Nd	Nd	5.4
Organic matter (%)	0.12	4.22	Nd
Oils and fats (ppm)	0.05	0.19	Nd
August 2004 (sediment)			
Chromium (ppm)	3.9	6.9	6.0
Sulfides (ppm)	Nd	Nd	80.4
Organic matter (%)	0.06	5.19	1.30
Oils and fats (ppm)	0.05	2.95	5.74
Nd = Not detected			

Table III. Frequency of micronucleate cells (MNC) and micronuclei (MN) in peripheral erythrocytes of *Pimelodus maculatus* and

Species/ collections/ sites	No. of individuals	Total cells	Total MN	Total MNC	X (%) ± SD	
					MN	MNC
<i>Pimelodus maculatus</i>						
April 2004						
Site 1 – (Reference)	10	40,000	105	103	0.105 ± 2.41	0.103 ± 2.41
Site 2	4	16,000	86	84	0.215 ± 1,65*	0.210 ± 1,22*
Site 3	11	44,000	249	249	0.226 ± 6,30*	0.221 ± 6,33*
August 2004						
Site 1 – (Reference)	11	44,000	147	141	0.133 ± 4.18	0.137 ± 5,40
Site 2	10	40,000	270	258	0.270 ± 8.01*	0.258 ± 6,70*
Site 3	10	40,000	313	307	0.315 ± 7,60*	0.305 ± 8,38*
<i>Leporinus friderici</i>						
August 2004						
Site 1 – (Referece)	04	16,000	38	38	0.095 ± 1,80	0.095 ± 1,80
Site 3	11	44,000	274	270	0.249 ± 4.01*	0.245 ± 4.09*

* Significant differences when compared with reference (site 1), according to the Mann-Whitney U-test, with a level of significance of $\alpha = 0.05$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ante a todo o explicitado nos capítulos, pode-se concluir que nas condições experimentais deste estudo:

- O SMART foi capaz de detectar genotoxicidade nas amostras das águas superficiais do Rio Paraguai, sendo os descendentes do cruzamento HB mais sensíveis à genotoxicidade que os do ST, demonstraram que as genotoxinas dos efluentes recebidos nos sítios deste estudo são de ação indireta;
- TMNP foi efetivo na avaliação *in situ*, as espécies *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici* demonstraram ser bons bioindicadores de genotoxicidade, sendo *P. maculatus* mais sensível;
- Águas do Rio Paraguai no trecho de Cáceres recebe efluentes genotóxicos que podem comprometer a qualidade de suas águas temporalmente e espacialmente, sendo sítio 4 mais crítico, seguido do sítio 2;
- As causas da genotoxicidade dos efluentes estudados podem ser pela presença de cromo, sulfetos, óleos e graxas e outros não avaliados por esta pesquisa, detectados na avaliação química das águas e sedimentos, que podem estar interagindo e produzindo efeitos aditivos, sinérgicos, ou efeitos antagônicos;
- Sugerem-se outros estudos para verificar as conseqüências da genotoxicidade detectada na população ribeirinha;
- São requeridas ações concretas e urgentes por parte da sociedade organizada e governamental, para reverter às condições destas águas, tendo em vista que as águas do Rio Paraguai fluem ao Pantanal.