

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

**Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento  
do Rio Japaratuba (Sergipe).**

**ALUNA: Silmara de Moraes Pantaleão**

**ORIENTADOR: Prof Dr Mario Antonio Spanó**

**UBERLÂNDIA – MG**

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

**Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento  
do Rio Japaratuba (Sergipe)**

**ALUNA: Silmara de Moraes Pantaleão**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**

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

**UBERLÂNDIA**

**2006**

P197i Pantaleão, Silmara de Moraes, 1961-

Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do Rio Japarutuba (Sergipe) / Silmara de Moraes Pantaleão. - Uberlândia, 2006.

107f. : il.

Orientador: Mário Antônio Spanó.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Mutagênese - Teses. I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575.224.4

## **KEYWORDS**

Produced Water, Genotoxicity, SMART, *Drosophila melanogaster*, Micronucleus, fish, River water.

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

**Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento  
do Rio Japaratuba (Sergipe)**

**ALUNA: Silmara de Moraes Pantaleão**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**

**Examinadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Catarina Satie Takahashi**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloisa Helena Rodrigues de Andrade**

**Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Morelli**

**Data da Defesa: 15 de fevereiro de 2006**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Prof. Dr Mario Antônio Spanó

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai  
*(in memória)*

Pelo amor e força constantes. Exemplo de perseverança, companheirismo e enorme amor à vida. Saudades.

A minha mãezinha,

Suas orações e seu amor me acompanharam por todo esse caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

A CAPES, a Universidade Federal de Sergipe e a Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio financeiro e institucional que possibilitaram a realização da pesquisa.

Ao final, poucos podem dizer que têm no orientador um amigo, com tudo o que numa amizade cabe. Assim, divido com o Prof. Mario todo o reconhecimento que este trabalho possa alcançar.

A minha enorme família, com meus queridos irmãos, sobrinhos, tios e primos, em quem me vejo e me defino.

Aos meus amigos-irmãos, de vida, de bares, de risos: Cacá e Ti Paulo, Raissa, Ri, Cris, Silma, Myrna, Ayda, Hortência, Bruno, Neila, Xandim, Zaira, Vânia, Elaine, Wender, Edson e Julin.

As mães e famílias mineiras que me acolheram e me fizeram sentir em casa: Cida, Sueli e querida família, Geraldo e Emília, Vó Assima, Tia Tereza.

Aos professores José do Patrocínio Hora Alves (DQI/UFS), Josefa Eliane S. de Siqueira (DGEO/UFS) pela valiosa ajuda na coleta de dados.

Aos funcionários da Universidade Federal de Sergipe e Universidade Federal de Uberlândia, sem cujo apoio este trabalho não seria realizado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

## **APOIO FINANCEIRO**

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU);
- Universidade Federal de Sergipe (UFSE).

“O guerreiro da luz às vezes se comporta como água, e flui entre os obstáculos que encontra.

Em certos momentos, resistir significa ser destruído, então ele se adapta as circunstâncias. Aceita, sem reclamar, que as pedras do caminho tracem seu rumo através das montanhas.

Nisto reside a força da água, ela jamais pode ser quebrada por um martelo, ou ferida por uma faca. A mais poderosa espada do mundo é incapaz de deixar uma cicatriz em sua superfície.

A água de um rio adapta-se ao caminho que é possível, sem esquecer do seu objetivo: o mar. Frágil em sua nascente, aos poucos vai ganhando a força dos outros rios que encontra.

E, a partir de determinado momento, seu poder é real”.

**Paulo Coelho**



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Table I.** Chemical Characterization of Water Samples Collected in March 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River (at Surface and Bottom) and from the Jacarecica River (Only at Surface).....65

**Table II.** Frequency of Micronucleated Cells in Peripheral Red Blood Cells of *Astyanax bimaculatus* and *Hoplias malabaricus* Collected in the Jacarecica River (reference) and the Japaratuba River (Sites 1 and 2, Experimental).....66

### CAPÍTULO II

**TABLE I.** Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard Cross (ST) after Chronic Treatment of Larvae with Water Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River (at Surface and Botton) and from the Jacarecica River (Only at Surface).....91

**TABLE II.** Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation Cross (HB) after Chronic Treatment of Larvae with Water Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River (at Surface and Botton) and from the Jacarecica River (Only at Surface).....92

**TABLE III.** Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard Cross (ST) after Chronic Treatment of Larvae with

Sediment Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River and from the Jacarecica River.....93

**TABLE IV.** Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation Cross (HB) after Chronic Treatment of Larvae with Sediment Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River and from the Jacarecica River.....94

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Efeito temporal do impacto de poluentes químicos no ambiente aquático (Gomes et al., 2000).....18

### CAPÍTULO I

**Fig. 1.** Map of Brazil showing Sergipe State and geographic locations of the Jacarecica and Japaratuba river hydrographic regions and diagram of the collection sites.....67

### CAPÍTULO II

**Fig. 1.** Map of South America with Brazil, Sergipe State and geographic location of the Jacarecica and Japaratuba river hydrographic region and diagram of the sampling sites.....95

**Figure 2.** Size distributions for single spots after chronic treatments with water MilliQ and water samples collected in March and July 2003 from two sites (1 and 2) on the Japaratuba River (at surface and botton) and from the Jacarecica River (only at surface).....96

**Figure 3.** Size distributions for single spots after chronic treatments with sediment samples collected in March and July 2003 from two sites (1 and 2) on the Japaratuba River and from the Jacarecica River.....97

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1B</b>	Amostra de água de fundo do Sítio 1 do Rio Japaratuba.
<b>1S</b>	Amostra de água de superfície do Sítio 1 do Rio Japaratuba.
<b>2B</b>	Amostra de água de fundo do Sítio 2 do Rio Japaratuba.
<b>2S</b>	Amostra de água de superfície do Sítio 2 do Rio Japaratuba.
<b>AP</b>	Água Produzida
<b>ARA</b>	Avaliação de Risco Ambiental.
<b>BH</b>	Heterozigoto balanceado.
<b>Co</b>	Cobalto.
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional de Meio Ambiente.
<b>Cu</b>	Cobre.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico.
<b>E&amp;P SEAL</b>	Exploração e Produção da bacia Sergipe-Alagoas.
<b>EPA</b>	Agência de Proteção Ambiental.
<b><i>flr</i><sup>3</sup></b>	Gene marcador <i>flare</i> localizado no cromossomo 3.
<b>HB</b>	Cruzamento de alta bioativação.
<b>MH</b>	Heterozigoto marcado.
<b>MN</b>	Micronúcleo.
<b>MNT</b>	Teste do Micronúcleo.
<b><i>mwh</i></b>	Gene Marcador <i>multiple wing hairs</i> localizado no cromossomo 3.
<b>NE</b>	Nordeste.
<b>Ni</b>	Níquel.
<b>OD</b>	Demanda de oxigênio.
<b>OECD</b>	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento.
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde.
<b>ORR; <i>flr</i><sup>3</sup></b>	Oregon R, <i>flare</i> <sup>3</sup> .
<b>PAHs</b>	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.
<b>Pb</b>	Chumbo.
<b>SMART</b>	Somatic Mutation And Recombination Test.
<b>ST</b>	Cruzamento padrão.
<b>Zn</b>	Zinco

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução geral</b> .....	14
1.1 Poluição em ambientes aquáticos.....	14
1.2 Água Produzida como fonte de poluição.....	19
1.3 Impacto do petróleo e seus derivados no Brasil.....	22
1.3.1 Rio Japaratuba.....	22
1.4 Monitoramento de ambientes aquáticos.....	24
1.5 Referências bibliográficas.....	32
<b>2. Objetivos</b> .....	44
2.1 Objetivos específicos.....	44
<b>Capítulo I: The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japaratuba River in Brazil</b> .....	46
<b>Capítulo II: The Drosophila Wing Spot Test to Assess the Impact of Pollution on the Japaratuba River in Brazil</b> .....	69
<b>3. Discussão Geral</b> .....	98
<b>4. Conclusão</b> .....	107

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 Poluição em ambientes aquáticos**

Os ambientes aquáticos têm sido os depósitos de diferentes tipos de descargas antropogênicas, uma vez que são os primeiros a receber dejetos contendo poluentes de várias fontes (OHE et al., 2004; RAJAGURU et al., 2001). Alguns contaminantes orgânicos, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenil policlorinados, pesticidas orgânicos, pentaclorodibenzofuranos e dibenzo-p-dioxinas policlorinadas são sempre detectados no ambiente aquático, mesmo que em quantidades mínimas. O comportamento de partição destes agentes químicos hidrofóbicos no sedimento, água e/ou biota é determinado principalmente por conteúdos de carbono orgânico e lipídios, sendo que quanto mais hidrofóbico maior será o seu parcionamento (MEADOR et al., 1995).

A descarga, o acúmulo e a persistência de efluentes constituem uma ameaça à vida, uma vez que eles são freqüentemente tóxicos e sua presença pode degradar seriamente o ambiente (FLEEGER et al., 2003; WHITE & RASMUSSEN, 1998).

Os PAHs são de grande importância neste contexto, devido às suas propriedades carcinogênicas. No ambiente aquático os PAHs associam-se com partículas em suspensão e com sedimentos de fundo. Muitos outros agentes químicos hidrofóbicos persistentes no ambiente também fazem esse tipo de associação. A introdução crônica destes agentes nos estuários pode afetar a qualidade da água de rios e induzir o seu acúmulo nas cadeias alimentares pelágicas e bênticas, em vários níveis tróficos, que à longo prazo levam à mudanças na biota. Embora a maioria dos compostos policíclicos seja volátil, alguns são degradáveis. Sua ocorrência em partículas aéreas, partículas suspensas em ambientes riverinos ou sedimentos sugerem que parte deles resiste ao processo de degradação. Tem sido hipotetizado que PAHs adsorvidos em partículas são mais acessíveis à degradação do que aqueles fortemente

ligados ou ocluídos em partículas (FERNANDES et al., 1997; LA ROCCA et al., 1996).

Os metais pesados, por sua vez, são um importante problema para os ecossistemas aquáticos, devido à sua estabilidade, persistência e comportamento cumulativo. Além disto, eles podem ser enriquecidos por diferentes organismos e convertidos a orgânicos complexos e, mais tóxicos (JAIN, 2004; ÇAVAS et al., 2005).

Nos sedimentos, a contaminação por poluentes antropogênicos também é preocupante, uma vez que movimentos pós-emissão e o parcionamento de compostos hidrofóbicos, entre os quais encontram-se muitos agentes genotóxicos, resultam em adsorção à matéria particulada suspensa e, por último, incorporação nos sedimentos. Desse modo, os sedimentos podem se tornar reservatórios para mutágenos hidrofóbicos ambientais, com processos de pós-sedimentação, levando ao acúmulo e/ou enterro desses agentes, o que contribui para a exposição da biota bêntica. O enterro de sedimentos persistentes pode formar um reservatório de risco mutagênico que pode ser continuamente reintroduzido na coluna d'água, via suspensão e transferência trófica (CHEN & WHITE, 2004).

Em baixas concentrações, substâncias tóxicas podem não ter efeitos agudos detectáveis nos organismos, mas podem reduzir sua sobrevivência através de efeitos a longo termo. Tais efeitos ocorrem em doses que são freqüentemente menores que as requeridas em efeitos agudos e podem se manifestar como danos em tecidos, danos genéticos em células somáticas e germinativas e desordens, como o câncer, que requerem longos períodos de latência antes de se tornarem clinicamente visíveis (WHITE & RASMUSSEN, 1998).

No entanto, a despeito das evidências que demonstram impactos genotóxicos em biotas aquáticas contaminadas, muitas substâncias são liberadas como misturas complexas. Assim, a fonte e a identidade precisa de agentes poluentes permanece desconhecida, uma vez que a avaliação de risco

mutagênico e/ou carcinogênico de misturas complexas, presentes em contaminantes antropogênicos, não é uma tarefa simples. Entre os aspectos a serem considerados nas interações químicas que resultam em danos ecotoxicológicos estão os efeitos sinérgicos e antagônicos, que ocorrem como resultado da complexidade dos compostos químicos presentes, e que conferem características específicas às misturas formadas. Outro fator que pode dificultar a identificação de possíveis efeitos sobre a comunidade é que os efeitos de poluentes podem ser altamente espécie-específicos (VARGAS et al., 2001; WHITE, 2002; CHEN & WHITE, 2004; HEWITT & MARVIN, 2005; BINELLI et al., 2005).

A presença de um xenobiótico em uma parte de um ecossistema aquático não é, por si só, indicativo de efeitos danosos. A expressão da toxicidade de uma substância química depende das características de sua exposição e de seu comportamento no organismo, relacionado aos mecanismos de transporte (toxicocinética) e de interações com sítios e órgãos-alvo. Por isso, conexões devem ser estabelecidas entre os níveis externos de exposição, níveis internos de contaminação tecidual, e efeitos adversos precoces (VAN DER OOST et al., 2003; AZEVEDO & CHASIN, 2003). Uma vez presentes no ambiente aquático, os xenobióticos contaminam os peixes através das guelras, pele, ou trato gastrointestinal. A contaminação de plantas se dá pelas células epidérmicas ou pêlos da raiz, causando alterações biológicas que podem afetar desde populações particulares até ecossistemas inteiros (OHE et al., 2004).

As implicações dos efeitos genotóxicos sobre espécies de vida silvestre incluem a indução de doenças (inclusive neoplasias) e a geração de defeitos hereditários e teratogenicidade, via mutações em células germinativas, assim como mortalidade (RAJAGURU et al., 2003; NEHLS & SEGNER, 2001; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998). Muitas mutações são provavelmente subletais, mas as implicações para a sobrevivência a longo tempo de populações nativas podem ser profundas (BICKHAM, 2002).

De modo geral, os compostos químicos podem danificar a molécula de DNA por meio de interações diretas ou geração metabólica de espécies reativas

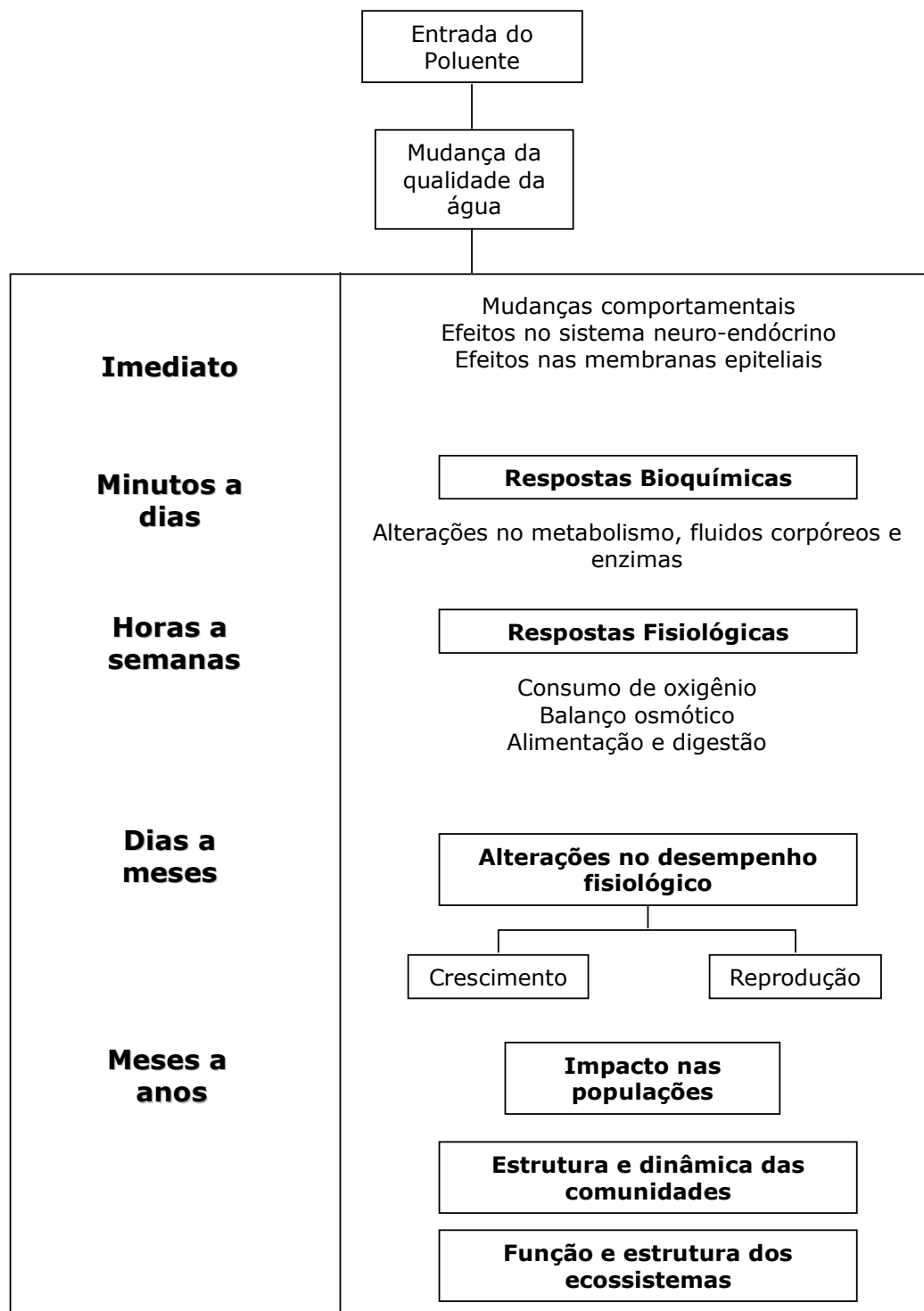


de oxigênio ou outros compostos DNA-reativos, cuja interação com o DNA induz alterações estruturais por meio de ligação covalente do composto às bases ou aos grupamentos fosfato. As alterações não reparadas podem potencializar outras lesões, levando à formação de tumores (DEVAUX et al., 1997).

Em peixes teleósteos, estudos pós-marcação de DNA com  $P^{32}$  demonstram que há uma relação dose-resposta entre a exposição ambiental aos PAHs e a formação de aductos de DNA em células hepáticas. Outras evidências mostram correlação entre exposição aos PAHs e mutação em oncogenes, induzindo alterações patofisiológicas na estrutura e função do fígado de peixes. Altos níveis de PAHs nos sedimentos têm sido correlacionados, também, com a presença de metabólitos na bile e aumento de radicais livre no fígado destes animais, além de anormalidades oculares (principalmente catarata) e ulcerações dérmicas. Sinais de estresse, como erosão aguda das nadadeiras, têm sido associados com exposição a poluentes específicos, tais como efluentes de fábricas, descarga de óleo cru, descarga de esgotos municipais ou a múltiplas variáveis ambientais (ROTCHHELL et al., 1995; WIKLUND & BYLUND, 1996; DEPLEDGE, 1996; HARGIS et al., 2000; VAN DEN HEUVEL et al., 2000).

Por todas essas razões, há uma tendência mundial para a associação de análises físico-químicas e bioensaios para avaliar os níveis de poluição em ambientes aquáticos. Devido ao desenvolvimento econômico, avanço tecnológico e a infinita exploração de novos químicos, incluindo uma variedade de compostos tóxicos indesejáveis, a perspectiva é de que águas de superfície em todo o mundo continuem a receber grandes quantidades de descargas antropogênicas e acidentais. A avaliação dos níveis de poluição pode ser realizada por meio de medidas ou determinação de concentrações nas matrizes ambientais (solo, sedimento, ar, água) ou pelo uso de organismos bioacumuladores (OHE et al., 2004; BINELLI et al., 2005).

A **Figura 1** mostra o efeito temporal do impacto de poluentes químicos no ambiente aquático, modificado de acordo com Gomes et al. (2000).



**Figura 1.** Efeito temporal do impacto de poluentes químicos no ambiente aquático (GOMES et al., 2000).

## 1. 2 Água Produzida como fonte de poluição

Entre os diferentes tipos de poluentes tipicamente atribuíveis à atividade humana, os derivados de petróleo têm grande relevância ecológica. O petróleo é uma mistura altamente complexa, composta por pequenas quantidades de enxofre, nitrogênio, oxigênio e traços de metais tais como: vanádio, níquel, ferro, sódio, cálcio, cobre e urânio. Porém, seus principais constituintes são carbono e hidrogênio que, na forma de hidrocarbonetos, freqüentemente excedem 75% de sua composição. A exposição dos ambientes aquáticos a estes produtos pode se dar por acidentes, avarias durante as perfurações submarinas, operações de carga e descarga de petroleiros, resíduos de combustão, ou mesmo de despejos de efluentes (água de produção ou água produzida) gerados na extração do petróleo (PACHECO & SANTOS, 2001).

A extração de petróleo e gás gera, como subproduto, grandes volumes de água produzida (AP), quando o petróleo bombeado de sedimentos marinhos é aquecido para remover a água salgada do óleo cru. A AP é constituída de uma mistura de água presente no reservatório com a água utilizada na recuperação secundária de petróleo, que ficou entre a formação geológica e misturou-se aos hidrocarbonetos extraídos (ROACH et al., 1993). A química destes efluentes depende da formação geológica de origem (COLLINS, 1975 *apud* WOODALL, 2003). Além de hidrocarbonetos, ela também possui altas concentrações de sal, metais pesados, biocidas, inibidores de corrosão, dispersantes, bloqueadores de emulsão, detergentes etc., que são potencialmente tóxicos e adicionados durante a produção e separação óleo/água (ROACH et al., 1993; ROE & JOHNSEN, 1996 *apud* STEPHENS et al., 2000; PICCARDO et al., 2001; ROTCHELL et al., 1995; HINKLE-CONN et al., 1998). A AP pode ser reinjetada ou, quando permitido, descarregada nas águas de superfície (ROACH et al., 1993).

O despejo de tais poluentes em rios e mares tem comprometido a biota de todo o mundo e atingido, indiretamente, a sobrevivência das comunidades que dependem dela (PACHECO & SANTOS, 2001). Em habitats estuarinos, a exposição crônica à poluição por petróleo é potencialmente mais danosa que derrames acidentais de petróleo (ROACH et al., 1993). Os componentes

particulados e dissolvidos da AP são encontrados tanto na coluna d'água quanto no sedimento, estando disponíveis assim para todo o ecossistema (STRØMGREN et al., 1995).

No entanto, os efeitos da descarga desses efluentes sobre o ambiente físico e a biota aquática dependem do volume de descarga, da caracterização química da descarga e da fisiografia e hidrografia do ambiente receptor (RABALAIS et al., 1998). Descargas em ambientes abertos e com maior profundidade, como golfos e baías, são melhores diluídas por correntes de maré, do que aquelas em baías de fluxo lento e faixas litorâneas protegidas, onde se espera que o impacto seja maior (ROACH et al., 1993).

Durante os últimos anos, as alterações ambientais causadas pela toxicidade da AP têm recebido maior atenção. A sua toxicidade pode estar relacionada a três grupos principais de componentes: ao material orgânico (hidrocarbonetos e fenóis); a metais pesados; e aos íons responsáveis pela salinidade e propriedades osmóticas da água. Os compostos orgânicos podem ser biodegradados ou volatilizados. As concentrações de compostos inorgânicos são constantes, embora a precipitação possa reduzir sua quantidade na fase aquosa. A biodegradação de material orgânico pode mudar a toxicidade de diferentes maneiras, alterando a taxa de hidrocarbonetos particulados/dissolvidos. Assim, produtos biodegradados apresentam toxicidade diferente, quando comparados aos compostos originais (STRØMGREN et al., 1995; SCHOLTEN et al., 2000). Desses grupos, os PAHs e os metais pesados têm recebido maior atenção, uma vez que muitos deles são potentes mutágenos e carcinógenos onipresentes em ambientes naturais (MINISSI et al., 1998; TELLI-KARAKOÇ et al., 2001; CESTARI et al., 2004; BAIRD et al., 2005).

Foi observado que os efeitos da AP sobre o corpo d'água receptor têm aspectos espaciais e temporais, tanto sobre o ambiente físico quanto sobre organismos aquáticos. De acordo com Rabalais et al. (1998) e Armstrong et al. (1979), os contaminantes podem se acumular em sedimentos adjacentes ou distantes do ponto de descarga de AP, sendo que a contaminação por hidrocarbonetos pode persistir através do tempo, tanto na superfície dos

sedimentos, assim como em suas camadas inferiores, resultando em altas concentrações em profundidades de 25 a 30 cm, em cores verticais. Assim, nos organismos bênticos, sinais e/ou efeitos derivados da contaminação podem ser mínimos próximo ao ponto de descarte, mas podem ser substanciais a grandes distâncias (WOODALL et al., 2003; RABALAIS et al., 1998).

A alta salinidade da AP também induz efeitos danosos sobre a qualidade das correntes de água doce, gerando morte de peixes e impactos na vegetação (ROACH et al., 1993).

Sobre os organismos, os efeitos tóxicos da AP devem-se à absorção de componentes solúveis através da superfície do epitélio (superfície do corpo e guelras) e/ou ingestão oral e digestão de material particulado (STRØMGREN et al., 1995).

Estudos sobre o efeito de diferentes concentrações de AP sobre embriões de peixes mostram que, mesmo em pequenas concentrações, a exposição crônica gera efeitos subletais, como alterações na capacidade natatória e na morfologia das guelras, como também indução e altas freqüências de efeitos clastogênicos (AC) em embriões de *Cyprinodon variegatus*. Quando há aumento na concentração de AP de 2% para 4%, as freqüências de AC aumentam proporcionalmente (5% e 20%, respectivamente), sugerindo que o efeito clastogênico é dose-dependente (DANIELS & MEANS, 1989; STEPHENS et al., 2000).

### **1.3 Impacto do petróleo e seus derivados no Brasil**

O Brasil possui 7.491 km de área costeira e a maior disponibilidade hídrica do planeta, com 13,8% do deflúvio médio mundial. Grande parte da população brasileira e das atividades industriais está concentrada na costa ou próxima a ela. Treze capitais de Estado e grandes cidades como Santos (SP), Rio Grande (RS) e Niterói (RJ), bem como alguns dos maiores parques industriais: Cubatão (SP), Camaçari (BA), Rio Grande (RS) estão localizados adjacentes à região costeira e áreas estuarinas (WRI, 1998; NIPPER, 2000; SILVA et al., 1997). As atividades de exploração, refino e transporte de petróleo são mais intensas nas áreas costeiras, que em áreas terrestres (SILVA et al., 1997).

O Estado de Sergipe, localizado na Região Nordeste do Brasil, abriga o maior campo petrolífero terrestre do País: o campo de Carmópolis, que abrange os municípios de Rosário do Catete, General Maynard, Maruim, Santo Amaro das Brotas e Japaratuba, possuindo mais de 1.200 poços de petróleo, dentro de uma área de 150 Km<sup>2</sup>. Ele representa a quarta reserva de óleo do País, é o principal campo produtor da Petrobrás/E&P SEAL (Exploração e Produção da bacia Sergipe-Alagoas) e está em operação desde 1963 (FONSECA, 1999).

A bacia do Rio Japaratuba possui uma área total de 1840 m<sup>2</sup>, abrangendo 8,4% do Estado de Sergipe, banhando 14 municípios do Estado. A porção inferior deste rio é utilizada pela Petrobrás como receptora dos efluentes gerados nas atividades de exploração e produção de petróleo.

#### **1.3.1 Rio Japaratuba**

O Rio Japaratuba situa-se no litoral norte do Estado de Sergipe e apresenta uma extensão de 124 km, passando ao largo de 14 municípios. Sua bacia drena uma área total de 1840 m<sup>2</sup> abrangendo 8,4% da área do Estado. Seu percurso apresenta uma orientação longitudinal no sentido Noroeste–Sudeste e, na região da foz, forma um estuário de forma peculiar “a semelhança de trombeta” cuja vazão é de 10,6m<sup>3</sup> /seg.

O Japarutuba é um rio relativamente raso, alcançando na foz, próximo a cidade de Pirambu (10° 42' 47.53''S e 36° 59' 18.76''W) a profundidade de 5 m. Enquadra-se no clima megatérmico subúmido CA'a', segundo a classificação de Thornthwaite, com temperatura média anual de 25°C. As precipitações, irregulares, na área de sua bacia, alcançam totais anuais em torno de 800 a 1.050 mm.

Estudos anteriores de caracterização ambiental e de monitoramento do Rio Japarutuba indicaram que a AP tem influenciado negativamente sobre a biota, causando erosão das nadadeiras e exoftalmia nos peixes, além de alterar o sabor de crustáceos e peixes. Análises físico-químicas revelaram que a água e o sedimento estão contaminados por Cu, Pb, Zn, Ni e Co (ALVES et al., 2000).

O despejo de efluentes industriais em rios é regulamentado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA, 2005), no artigo 24 da Resolução 357 de 17/03/2005. No entanto, programas de monitoramento são descontínuos e estão concentrados nas regiões sudeste e sul do País. Em sua maioria, os trabalhos são realizados em represas artificiais, limitando o conhecimento a áreas isoladas e a ecossistemas lênticos (BUSS et al., 2003).

De acordo com Silva et al. (1997), a grande maioria dos trabalhos realizados com o objetivo de avaliar a contaminação de águas costeiras do Brasil, restringe-se à observação de efeitos macroscópicos nos organismos.

O presente trabalho representa a primeira avaliação do impacto genotóxico de AP de um complexo petroquímico, em amostras de água e sedimento, por meio de bioensaios, realizado no Estado de Sergipe.

## 1.4 Monitoramento de ambientes aquáticos

Na avaliação dos efeitos de xenobióticos em ambientes aquáticos, é cada vez mais evidente que a análise química da água ou sedimentos, pode não demonstrar o grau de toxicidade e ser pouco representativa quanto aos impactos ambientais, pois a poluição química ocorre, freqüentemente, como uma mistura complexa (DEVAUX et al., 1998; NIPPER, 2000; VIGANÓ et al., 2001; JHA, 2004).

De acordo com Nipper (2000) e Adams (2005), os efeitos biológicos deveriam ser avaliados antes da análise química dos contaminantes, pois eles têm a capacidade de ajudar a compreender os mecanismos básicos da contaminação do ecossistema. Além disso, eles são sensíveis em concentrações abaixo daquelas que causam citotoxicidade e, por isso, podem refletir problemas ambientais subestimados ou não aparentes (ALLAN et al., 2005).

Organismos que estão em contato direto com compartimentos ambientais contaminados são bem adequados para tais sistemas de avaliação. O uso de parâmetros biológicos, para medir a qualidade da água, baseia-se nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem. Como os rios estão sujeitos a inúmeras perturbações, a biota aquática reage a esses estímulos, sejam eles naturais ou antropogênicos. As respostas à presença de contaminantes em seu ambiente são dadas de modo mensurável e predizível, desde o nível biomolecular, onde os poluentes podem causar danos às macromoléculas, interagindo com seu DNA e, assim, provocar estratégias defensivas (como detoxificação e mecanismos de reparo), até em nível de organismo, onde distúrbios severos geram danos no crescimento e reprodução, anormalidades no desenvolvimento ou diminuição da sobrevivência (SHUGART et al., 1992; RAJAGURU, 2001; 2003; BUSS et al., 2003).

Todas estas evidências têm alertado para a necessidade do desenvolvimento de métodos para identificação, avaliação, comparação e gerenciamento dos riscos decorrentes dos despejos de poluentes químicos no ambiente (CAJARAVILLE et al., 2000).

De acordo com Buss et al. (2003), o primeiro passo para a resolução dos problemas sócio-ambientais, gerados pela má gestão dos recursos hídricos, é o



desenvolvimento de metodologias de diagnóstico eficientes. A partir da segunda metade dos anos 70, as pesquisas sobre monitoramento biológico (MB) aumentaram de modo quase exponencial e, desde então, ele pode ser entendido como prática repetitiva e regular, para avaliar as mudanças espaço-temporais dos indicadores (PIVETTA et al., 2001).

A categorização de biomarcadores e bioindicadores, ou organismos sentinela, engloba a Avaliação de Risco Ambiental (ARA), definida como “procedimentos pelos quais os efeitos adversos prováveis ou reais, de poluentes e atividades antropogênicas sobre ecossistemas e seus componentes, são estimados com um grau conhecido de certeza, usando metodologias científicas” (DEPLEDGE & FOSSI, 1994 *apud* VAN DER OOST et al., 2003). Estes procedimentos têm adquirido maior importância à medida que aumenta a percepção, tanto de cientistas ambientais, quanto do público em geral, dos efeitos danosos de agentes químicos sobre os recursos naturais (VAN DER OOST et al., 2003).

Para avaliar a saúde de organismos expostos a xenobióticos, vários marcadores biológicos têm sido utilizados. Embora a categorização seja variada e confusa, e os limites entre cada categoria se sobreponham, as definições usadas por Van Gestel & Van Brumelen (1994) (*apud* Van Der Oost et al., 2003) dão uma visão geral sobre o assunto. Nesta definição, três conceitos são importantes:

1. **Biomarcador** - definido como qualquer resposta biológica a um produto químico ambiental, medido dentro de um organismo ou em seus produtos (urina, fezes, cabelo, plumas, etc.), que indica um desvio do estado normal que não pode ser detectado no organismo inteiro.
2. **Bioindicador** ou **organismo sentinela** - seria o organismo que fornece a informação sobre as condições ambientais de seu habitat, pela sua presença ou ausência ou, ainda, por seu comportamento.
3. **Indicador ecológico** - definido como um parâmetro do ecossistema, descrevendo a estrutura e funcionamento deste.

De acordo com sua atuação, os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes (AZEVEDO & CHASIN, 2003; VAN DER OOST, 2003):

- **Biomarcadores de exposição ou de dose interna:** abrangem a detecção e quantificação de um xenobiótico, seu(s) metabólito(s) ou o(s) produto(s) de interações entre este agente e moléculas e células-alvo, em um compartimento dentro de um organismo.
- **Biomarcadores de Efeito:** qualquer alteração mensurável em nível bioquímico, fisiológico ou comportamental, dentro de tecidos ou fluidos corporais de um organismo, que possa estar associada com um problema de saúde ou doença, já estabelecido ou com potencialidade de ocorrer.
- **Biomarcadores de suscetibilidade:** indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo para responder à exposição a uma substância xenobiótica específica. Neste conjunto incluem-se fatores genéticos e mudanças em receptores, os quais alteram a suscetibilidade de um organismo àquela exposição.

Muitos testes de toxicidade e genotoxicidade (biomarcadores ou bioindicadores) têm sido propostos e aplicados em áreas críticas (VIGANÓ et al., 2001). De acordo com Nadig et al. (1998) os bioindicadores de poluição podem ser ecologicamente mais sensíveis e relevantes que a simples medida dos níveis de poluentes no ambiente.

O principal interesse no uso de um biomarcador reside em sua habilidade para atuar como sinal de alerta precoce, uma vez que compostos tóxicos têm, em princípio, um impacto tanto em nível molecular quanto subcelular, antes que seus efeitos sejam observados no organismo como um todo; como também ajuda a identificar relações imprevistas entre a exposição a contaminantes tóxicos e risco aumentado de efeitos sobre indivíduos e populações que possam levar à diminuição da integridade ecológica (MAGNI et al., 2005).

Em geral, nenhum biomarcador pode dar um diagnóstico completo dos efeitos da poluição em ambientes aquáticos e, por isso, um conjunto de biomarcadores deve ser usado, junto com outras medidas químicas e biológicas (CAJARAVILLE et al., 2000).

O impacto sobre a integridade do DNA celular é o primeiro evento após a exposição a um agente genotóxico. Este impacto pode ser monitorado por meio

de testes biomarcadores, capazes de detectar alterações fenotípicas, como resultado de mutações, anormalidades cromossômicas grosseiras, erros na síntese do DNA, aductos de DNA e quebras de fitas simples ou duplas de DNA, tendo cada um deles sensibilidade e especificidade variáveis (SAVVA, 1998; DIXON et al., 2002).

Quanto às espécies sentinela, a escolha depende de vários critérios, como abundância no ambiente em questão, fisiologia conhecida e sua capacidade de responder com estratégias especificamente designadas para detectar mudanças fisiológicas e comportamentais, quando sujeitas a um evento de poluição (BUSS et al., 2003; ALLAN et al., 2005). No monitoramento de ambientes aquáticos, sejam marinhos ou de água doce, um grande número de organismos-teste cobrindo muitos dos diferentes níveis tróficos, deve ser empregado (FARRÉ & BARCELÓ, 2003).

De acordo com Sanchez-Galan et al. (1999), para estudos de genotoxicidade, a escolha da espécie sentinela deve recair sobre aquelas que sejam largamente distribuídas entre ecossistemas; que sejam fáceis de serem mantidas em condições de laboratório; e que sejam sensíveis às substâncias genotóxicas.

Nos últimos anos, efeitos subletais de poluentes, sobre a integridade do DNA, têm sido relatados em organismos aquáticos, particularmente em peixes. Eles ocupam o topo da cadeia alimentar e são excelentes fontes de material para o estudo do potencial mutagênico e/ou carcinogênico de amostras de água. São vertebrados aquáticos que podem metabolizar, concentrar e estocar poluentes. O contato direto com muitas classes de químicos dissolvidos se dá através da superfície de suas guelras, podendo interferir com a respiração e a homeostase iônica (VAN DEN HEUVEL et al., 2000; TELLI - KARAKOÇ et al., 2001; RUSSO et al., 2004).

Biomarcadores em peixes podem ser instrumentos úteis em várias etapas do processo de avaliação de risco: efeito, exposição, caracterização ou classificação de risco e monitoramento da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos (VAN DER OOST, 2003).

O uso de bioensaios de curta duração, os quais podem detectar uma grande faixa de substâncias químicas que podem produzir danos genéticos, tem permitido a quantificação de risco mutagênico sem uma informação *a priori* sobre a identidade ou propriedades físico-químicas (OHE et al., 2004).

Em ambientes aquáticos, os efeitos genotóxicos de agentes químicos têm sido testados diretamente em peixes, por meio do teste do micronúcleo (TMN) (NEPOMUCENO et al., 1997; MATSUMOTO & CÓLUS, 2000) e, indiretamente, em células de asas de *Drosophila melanogaster*, por meio do teste da mancha da asa (AMARAL et al., 2005).

O TMN em peixes (HOSE et al., 1987; HOOFTMAN & DE RAAT, 1982;) é uma técnica útil para testar mutagenicidade *in vivo* e mostra potencial para monitoramento de qualidade da água. Algumas das vantagens do TMN são: simplicidade, confiabilidade e sensibilidade. Quando aplicado em peixes, apresenta inúmeras vantagens sobre outros testes citogenéticos, tais como os testes para detecção de trocas entre cromátides-irmãs e aberrações cromossômicas (AC), pelo fato destes serem demorados e não muito efetivos, devido ao número relativamente grande de cromossomos pequenos, que é encontrado em muitas espécies de peixes (AYLON & GARCIA-VASQUEZ, 2000; MATSUMOTO & CÓLUS, 2000).

Além disto, o micronúcleo (MN) é bem característico e pode ser facilmente reconhecido (AL-SABTI & METCALFE, 1995; BARŠIENĖ et al., 2004). A técnica tem sido usada extensivamente sob condições *in situ* (AL-SABTI & METCALFE, 1995; MINISSI et al., 1996; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003; ANDRADE et al., 2004; BUSCHINI et al., 2004; PANTALEÃO et al., 2006) e laboratoriais (NEPOMUCENO et al., 1997; MASUDA et al., 2004).

O MN deriva de fragmentos cromossômicos e/ou cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase. Assim, esse teste pode ser usado para demonstrar tanto efeitos clastogênicos quanto aneugênicos (NORPPA & FALCK, 2003). Os efeitos clastogênicos de agentes químicos e físicos sobre células de peixes, com ênfase sobre a indução de micronúcleos (MN) em teleósteos, e um sumário de várias técnicas que têm sido usadas para a análise de MN em peixes foram descritos por Al-Sabti & Metcalfe (1995).

Outros bioensaios também têm sido empregados na avaliação de efeitos genotóxicos/mutagênicos em amostras ambientais. A mosca de frutas *D. melanogaster* constitui um organismo bem adaptado a testes de mutagenicidade, e tem sido demonstrado que grande número de promutágenos e procarcinógenos provoca efeitos mutagênicos nestas espécies. Assim, *D. melanogaster* está apta a metabolizar xenobióticos em intermediários reativos, os quais induzem mutagenicidade (BAARS, 1980).

Um dos métodos utilizados para detectar e quantificar atividade recombinogênica de agentes químicos e físicos é o Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART), em células de asas de *D. melanogaster*, também conhecido como teste da mancha da asa. Este teste é realizado por meio de cruzamentos experimentais, utilizando três linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas: multiple wing hairs (*mwh*, 3-0,3) e *flare-3* (*flr<sup>3</sup>*, 3-38,8): [1] linhagem multiple wing hairs (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem *flare-3*, com constituição genética *flr<sup>3</sup> / In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*; [3] linhagem Oregon R, *flare-3*, com constituição genética *ORR; flr<sup>3</sup> / In(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*.

O marcador *flr<sup>3</sup>* em homozigose é letal, ou seja, indivíduos homozigotos para o *flr<sup>3</sup>* não conseguem se desenvolver até a fase adulta (GRAF et al., 1984; GUZMÁN-RINCÓN & GRAF, 1995). Por isso, foi desenvolvido um cromossomo balanceador *TM3, Bd<sup>S</sup>* (*Third Multiple 3, beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem. A presença deste balanceador torna inviável a recombinação, ou seja, a troca de material genético entre cromossomos homólogos, devido à presença de múltiplas inversões neste cromossomo (LINDSLEY & ZIMM, 1992).

A indução da perda de heterozigose destes marcadores nas células dos discos imaginais da larva, por tratamento com compostos genotóxicos, leva à formação de clones de células mutantes, os quais se expressam, após a metamorfose, em um mancha mutante na asa (SPANÓ & GRAF, 1998). O SMART tem sido empregado em avaliações de genotoxicidade por ter a capacidade de discriminar agentes mutagênicos, clastogênicos, aneugênicos e/ou recombinogênicos (AMARAL et al., 2005).

Dois diferentes cruzamentos são usados para produzir as populações experimentais de larvas: um cruzamento padrão (ST – standard cross), que detecta agentes genotóxicos diretos; e um cruzamento de alta bioativação (HB - high bioactivation cross) que é caracterizado por uma alta sensibilidade a promutágenos e procarcinógenos, devido à introdução do cromossomo 2 da linhagem selvagem Oregon R (ORR), resistente ao DDT (DAPKUS & MERRELL, 1977). Esta linhagem ORR;  $flr^3$  é caracterizada por um aumento na atividade de enzimas citocromo P-450 (HÄLLSTROM & BLANCK, 1985).

Assim sendo, o ST é útil na detecção de agentes genotóxicos diretos, enquanto que o HB é útil na detecção de agentes genotóxicos indiretos ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos. Ambos cruzamentos produzem dois tipos de progênie: 1) heterozigoto marcado ( $mwh + / + flr^3$ ) (MH); 2) heterozigoto balanceado ( $mwh + / TM3, Bd^S$ ) (BH). Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo *mwh* ou *flare*, ou como manchas gêmeas mostrando áreas adjacentes *mwh* e *flare*. As manchas simples são produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção), recombinação, ou não disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação. Nos indivíduos BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo *mwh*, produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou não-disjunção, pois devido à presença de uma série de inversões cromossômicas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis (GRAF et al., 1984).

O SMART de asa, quando empregado em trabalhos de monitoramento ambiental, tem se mostrado altamente sensível para detectar agentes genotóxicos ambientais em partículas aéreas (GRAF & SINGER, 1989; DELGADO-RODRIGUEZ et al., 1995; 1999) assim como em amostras de água (AMARAL et al., 2005).

Em suma, no panorama atual da avaliação de risco ambiental, observa-se uma tendência à convergência nas metodologias de monitoramento de ecossistemas, com o estabelecimento de uma rede integrada, para avaliação de risco da saúde humana e ecológica (SUTER II et al., 2005).

De acordo com Suter II et al. (2005), uma vez que a exposição de organismos humanos e não humanos a produtos químicos presentes no ambiente resulta das mesmas fontes, assim como a liberação, transporte e transformação de químicos se dão por meio dos mesmos processos, as estimativas, dados de ambiente físico e químico, modelos de transporte e destino e, por fim, os resultados de monitoramento ambiental devem ser comuns a ambos.

## 1. 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, p.649–657, 2005.

ALLAN, I. J.; VRANA, B.; GREENWOOD, R.; MILLS, G. A.; ROIG B. & GONZALEZ, C. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. **Talanta** (in press), 2005.

AL-SABTI, K. & METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

ALVES, J. P. H.; OLIVEIRA, A. P. C. & MELO, R. P. A. Metais pesados em sedimentos do rio Japarutuba. **Cadernos UFS: Química & Meio Ambiente**, v.2, p.21-33, 2000.

AMARAL, V. S.; DA SILVA, R. M.; REGULY, M. L. & ANDRADE, H. H. R. *Drosophila wing* - spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. **Mutation Research**, v.583, p.63-74, 2005.

ANDRADE V. M.; SILVA J.; SILVA, F. R.; HEUSER V. D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L. & FREITAS, T. R. O. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.44, p.459-468, 2004.

AYLON, F. & GARCIA-VASQUEZ, E. Induction of Micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, v.467 (2), p.177-186, 2000.

AZEVEDO, F. A. de & CHASIN, A. A. M. (Coord). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMA, 2003. – São Paulo: Intertox, 2003.



BAARS, A. J. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. **Drug Metabolism Reviews**, v.11, p.191-221, 1980.

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L. A. & MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environment and Molecular Mutagenesis**, v.45, p.106-114, 2005.

BARŠIENĖ, J.; LAZUTKA, J.; ŠYVOKIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; BAGDONAS, E.; BJORNSTAD, A. & ANDERSEN, O.K. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. **Environmental Toxicology**, v.19, p.365-371, 2004.

BICKHAM, J. W. Genetic effects of environmental contaminants: From molecules to populations. **Mutagenesis**, v.17, p.552, 2002.

BINELLI, A.; RICCIARDI, F.; RIVA, C. & PROVINI, A. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in zebra mussels from the Italian Great Lakes. **Chemosphere** v.6, p.1074–1082, 2005.

BRASIL. Resolução CONAMA nº. 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jul. 2005.

BUSCHINI A.; MARTINO A.; GUSTAVINO B.; MONFRINOTTI, M.; POLI P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DÖRR, A. J. M. & RIZZONI, M. 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**, v.557, p.119-129, 2004.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F. & NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p. 1-13, 2003.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v.247, p.295-311, 2000.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N. N. & ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.569–574, 2005.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S. & FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, p.270-274, 2004.

CHEN, G. & WHITE, P. A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v.567, p.151-225, 2004.

DANIELS, C. B. & MEANS, J. C. Assessment of the genotoxicity of produced water discharges associated with oil and gas production using a fish embryo and larval test. **Marine Environmental Research**, v.28, p.303-307, 1989.

DAPKUS, D. & MERRELL, D. J. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.87, p.685-697, 1977.

DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTÍZ-MARTELLO, R.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GÓMEZ-ARROYO, S. & GRAF, U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, v.39, p.33-43, 1999.

DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTÍZ-MARTTELO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R. & GOMEZ-ARROYO, S. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.341, p.235-247, 1995.

DEPLEDGE, M. H. Genetic ecotoxicology: a overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.200, p.57-66, 1996.

DEVAUX, A.; FLAMMARION, P.; BERNARDON, V.; GARRIC, J. & MONOD, G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of dna damage and cytochrome p4501a induction in chub (*Leuciscus cephalus*). **Marine Environmental Research**, v.46, p.257-262, 1998.

DEVAUX, A.; PESONEN, M. & MONOD G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, v.11, p.71-79, 1997.

DIXON, D.R.; PRUSKY, A.M.; DIXON, L.R.J. & JHA, A.N. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v. 17, p. 495-507, 2002.

FARRÉ M. & BARCELÓ D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, p.299-310, 2003.

FERNANDES, M. B.; SICRE, M. A.; BOIREAU, A. & TRONCZYNSKI, J. Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Distributions in the Seine River and its Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v.34, p.857-867, 1997.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R. & NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **The Science of the Total Environment**, v.317, p.207-233, 2003.

FONSECA, R. M. R. A Importância do aproveitamento da água resultante da produção de petróleo. 1999. 94 f. Monografia (Especialização) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

GOMES, A. S.; PALMA, J. J. C. & SILVA, C. G. Causas e conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. **Revista Brasileira de Geofísica**, v.18, p.447-454, 2000.

GRAF, U. & SINGER, D. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): effects of extracts of airborne particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters. **Chemosphere**, v.19, p.1094-1097, 1989.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. & KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila Melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p.153-188, 1984.

GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth, F. M.; Corkum, L. D. & Guzmán-Rincón J. (eds) **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. New York: Plenum Press. p.169-181, 1995.

HÄLLSTRÖM, I. & BLANCK, A. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. **Chemico-Biological Interactions**, v.56, p.157-171, 1985.

HEWITT, L. M. & MARVIN C. H. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. **Mutation Research**, v.589, p.208–232, 2005.

HINKLE-CONN, C.; FLEEGER, J. W.; GREGG, J. C. & CARMAN, K. R. Effects of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on feeding behavior in juvenile

spot (*Leiostomus xanthurus* Lacépède: Pisces) **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.227, p. 113-132, 1998.

HOOFTMAN, R. N. & DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral-blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, v.104, p.147-152, 1982.

HOSE, J. E.; CROSS, J. N.; SMITH, S. G. & DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. **Marine Environmental Research**, v.22, p.167-176, 1987.

JAIN, C. K. Metal fractionation study on bed sediments of river Yamuna, India. **Water Research**, v.38, p.569-578, 2004.

JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. **Mutation Research**, v.552, p.1-17, 2004.

LA ROCCA, C.; CONTI, L.; CREBELLI, R.; CROCHI, B.; IACOVELLA, N.; RODRIGUEZ, F.; TURRIO-BALDASSARRI, L. & DI DOMENICO, A. PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.33, p.236-245, 1996.

LINDSLEY, D. L. & ZIMM, G. G. (eds.). **The genome of *Drosophila melanogaster***. Academic Press, San Diego, CA.

MAGNI, P.; DE FALCO, G.; FALUGI, C.; FRANZONI M.; MONTEVERDE, M.; PERRONE, E.; SGRO M. & BOLOGNESI, C. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). **Environmental Pollution** p.1-8, 2006. Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=QuickSearchListURL&\\_method=list&](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=QuickSearchListURL&_method=list&)

[\\_aset=V-WA-A-W-A-MsSAYWA-UUW-U-AAVUBDUWBV-AABDECAUBV-ZUWZUDBEB-A-](#)

[U& sort=d&view=c& st=13& acct=C000037900& version=1& userid=687360&md5=022a91a649dd03ec50c46adf9016910f>](#) Acessado em 20-01-2006.

MASUDA, S.; DEGUCHI, Y.; MASUDA, Y.; WATANABE, T.; NUKAYA, H.; TERAOKA, Y.; TAKAMURA, T.; WAKABAYASHI, K. & KINAE, N. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, v.560, p.33-40, 2004.

MATSUMOTO, F. E. & CÓLUS, L. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.489-492, 2000.

MEADOR, J. P.; STEIN, J. E.; REICHERT, W. L. & VARANASI, U. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.143, p.79-165, 1995.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E. & RIZZONI, M. 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**, v.367, p.245-251, 1996.

MINISSI, S.; CACCESE, D.; PASSAFIUME, F.; GRELLA, A.; CICCOTTI, E. & RIZZONI, M. 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**, v.420, p.77-84, 1998.

MITCHELMORE, C. L. & CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v.399, p.135–147, 1998.

NADIG, S. G.; LEE, K. L. & ADAMS, S. M. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD assay. **Aquatic Toxicology**, v.43, p.163-178, 1998.

NEHLS, S. & SEGNER, H. Detection of DNA damage in two cells lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. **Environmental Toxicology**, v.16, p.321-329, 2001.

NEPOMUCENO, J. C.; FERRARI, I.; SPANÓ, M. A. & CENTENO, A. J. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environment and Molecular Mutagenesis**, v.30, p.293-297, 1997.

NIPPER, M. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessments in coastal environments: Brazilian perspective aquatic. **Ecosystem Health and Management**, v.3, p.433-447, 2000.

NORPPA, H. & FALCK, G. C-M. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v.18, p.221–233, 2003.

OHE T.; WATANABE, T. & WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.567, p.109–149, 2004.

PACHECO, M. & SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.64-75, 2001.

PANTALEÃO S. M.; ALCÂNTARA, A. V.; ALVES, J. P. H. & SPANÓ, M. A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba

River in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, 2006 (in press). Disponível em:

<<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112223744/PDFSTART>>

Acessado em 20-01-2006.

PICCARDO, M. T.; CORADEGHINI, R. & VALERIO, F. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon pollution In: native and Caged mussels. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.951-956, 2001.

PIVETTA, F.; MACHADO, J. M. H.; ARAÚJO, U. C.; MOREIRA, M. F. R. & APOSTOLI, P. Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em Saúde Pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p.545-554, 2001.

RABALAIS, N. N.; SMITH, L. E.; HENRY JR., C.B.; ROBERTS, P. O. & OVERTON, E. B. Long-term effects of contaminants from OCS-produced water discharges at Pelican Island Facility, Louisiana a. OCS Study MMS 98-0039. U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, New Orleans, Louisiana, 1998, 88pp. Disponível em:

<<http://www.mms.gov/itd/abstracts/98-0039a.html>> Acessado em 09-01-2006>

RAJAGURU, P.; KALPANA, B.; HEMA, A.; SUBA, S.; BASKARASETHUPATI, B.; KUMAR, P. A. & KALAISELVI, K. Genotoxicity of some sulfúur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.38, p.316:322, 2001.

RAJAGURU, P.; SUBA, S.; PALANIVEL, M. & KALAISELVI, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.41, p.85-91, 2003.

ROACH, R. W.; CARR, R. S.; HOWARD, C. L. & CAIN, B. W. **An Assessment of Produced Water Impacts in the Galveston Bay System**. Published Reports,



1993. Disponível em: <[http://www.orion.cr.usgs.gov/dec\\_reports/123/report.html](http://www.orion.cr.usgs.gov/dec_reports/123/report.html)>. Acessado em 17-10-2005.

RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLLON, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v.56, p.442–448, 2003.

ROTCHHELL, J. M.; STAGG, R. M. & CRAFT, A. Chemically - induced genetic damage in fish: isolation and characterization of the dab (*Limanda limanda*) RAS gene. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, p.457-459, 1995.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A. & STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environmental. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v.57, p.168-174, 2004.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and european minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.43, p.301-304, 1999.

SAVVA, D. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.41, p.103-6, 1998.

SCHOLTEN, M. C. T.; KARMAN, C. C. & HUWER, S. Ecotoxicological risk assessment related to chemicals and pollutants in off-shore oil production. **Toxicology Letters**, v.112-113, p.283-288, 2000.

SERGIPE. Atlas digital sobre recursos hídricos de Sergipe. Aracaju-SE, SEPLANTEC. 2004.

SHUGART, L. R.; McCARTHY, J. F. & HALBROOK, R. S. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. **Risk Analysis**, v.12, p.353-360, 1992.

SILVA, E. M.; PESO-AGUIAR, M. C.; NAVARRO, M. de F. T. & CHASTINET, C. B. A. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.16, p.112-118, 1997.

SPANÓ, M. A. & GRAF, U. Segundo taller sobre SMART: um método para detectar las actividades mutagénica e recombinogénica em células somáticas de *Drosophila* em la Universidad Federal de Uberlândia (MG), Brasil. **Internacional de Contaminación Ambiental**, v.14, p.111-114, 1998.

STEPHENS, S. M.; FRANKLING, S. C.; STAGG, R. M. & BROWN, J. A. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. **Marine Pollution Bulletin**, v.40, p.928-937, 2000.

STRØMGREN, T.; SØRSTRØRM, S. E.; SCHOU, L.; KAARSTAD, I.; AUNAAS, T.; BRAKSTAD, O. G. & Johansen, Ø. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. **Marine Environmental Research**, v.40, p.147-169, 1995.

SUTER II, G. W.; VERMEIRE, T.; MUNNS – JR, W. R. & SEKIZAWA, J. An integrated framework for health and ecological risk assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.20, p.611-616, 2005.

TELLI-KARAKOÇ, F.; GAINES, A. F.; HEWER, A. & PHILLIPS, D. Differences between blood and liver aromatic DNA adduct formation. **Environment International**, v.26, p.143-148, 2001.

TUCCI, C. E. **Gestão de água no Brasil**. Brasília, UNESCO, 2001. 156p.

VAN DEN HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MacKINNON, M. & DIXON, D. G. Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, p.334-341, 2000.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J. & VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.

VARGAS V.M.; MIGLIAVACCA S.B.; DE MELO A.C.; HORN R.C.; GUIDOBONO R. R., DE SA FERREIRA I.C. & PESTANA M.H. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutation Research**, v.90, p.141-58, 2001.

VIGANÓ, L.; ARILLO, A.; FALUGI, C.; MELODIA, F. & POLESELLO, S. Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the adriatic sea. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.887-894, 2001.

WHITE, P. A. & RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v.410, p.223-236, 1998.

WHITE, P. A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. **Mutation Research**, v.515, p.85–98, 2002.

WIKLUND, T. & BYLUND, G. Fin abnormalities of pikeperch in coastal áreas off the finnish south coast. **Journal of Fish Biology**, v.48, p.52-657, 1996.

WOODALL, D. W.; RABALAIS, N. N.; GAMBRELL, R. P. & DELAUNE, R. D. Comparing methods and sediment contaminant indicators for determining produced water fate in a Louisiana estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p.731–740, 2003.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico de amostras de água e sedimento dos Rios Japaratuba e Jacarecica (SE), por meio do SMART em células de asas de *D. melanogaster* e do TMN em peixes *A. bimaculatus* e *H. malabaricus*.

### 2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de amostras de água e sedimento do Rio Japaratuba por meio do TMN.
- Avaliar os efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos de amostras de água e sedimento do Rio Jacarecica por meio do TMN.
- Correlacionar as freqüências de MN observadas nos peixes do Rio Japaratuba com os do Rio Jacarecica.
- Correlacionar as freqüências de MN observadas entre as duas espécies.
- Avaliar os efeitos mutagênicos e recombino-gênicos de amostras de água e sedimento de diferentes pontos do Rio Japaratuba por meio do SMART em células de asa de *D. melanogaster*.
- Avaliar os efeitos mutagênicos e recombino-gênicos de amostras de água e sedimento do Rio Jacarecica por meio do SMART em células de asa de *D. melanogaster*.
- Comparar as freqüências de manchas mutantes observadas nos tratamentos com água e sedimento dos Rios Japaratuba e Jacarecica.
- Comparar as freqüências de manchas mutantes de acordo com a sazonalidade.

- Correlacionar os resultados obtidos por meio dos bioensaios TMN e SMART, na avaliação da genotoxicidade das amostras de água e sedimento dos Rios Japaratuba e Jacarecica.

Environ Mol Mutagen 47(3): 219-224, 2006

## **CAPITULO I**

The Piscine Micronucleus Test to Assess the impact of Pollution on the  
Japaratuba River in Brazil

## **The Piscine Micronucleus Test to Assess the Impact of Pollution on the Japarutuba River in Brazil**

Silmara de Moraes Pantaleão<sup>1,3</sup>, Ayda Vera Alcântara<sup>1</sup>, José do Patrocínio Hora Alves<sup>2</sup> and Mário Antônio Spanó<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão (Estado de Sergipe – SE), Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Química Analítica Ambiental, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão (Estado de Sergipe – SE), Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, (Estado de Minas Gerais – MG), Brazil

**Running title:** Micronuclei in fish from Japarutuba River

\*Corresponding author address: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil. Tel.: +55 34 32182505.

E-mail address: [maspano@ufu.br](mailto:maspano@ufu.br)

**Funded by:**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- Universidade Federal de Uberlândia

## RESUMO

Investigações in situ dos efeitos de poluentes mutagênicos (monitoramento ambiental) têm, crescentemente, usado bioindicadores, e os peixes freqüentemente são usados nesses estudos como organismos sentinela. No presente estudo, nós usamos o Teste do Micronúcleo (TMN) em peixes como um indicador biológico in situ de contaminação química em duas espécies de peixes de água doce (*Astyanax bimaculatus* and *Hoplias malabaricus*). Os peixes foram coletados no Rio Japaratuba (Sergipe, Brasil) em uma área impactada por uma industria petroquímica (Sítios 1 e 2) , a qual descarta indiretamente efluente tratado (água de produção) no rio. Respostas em peixes desses sítios foram comparadas a de peixes de um sítio de referência (Rio Jacarecica – Sergipe, Brasil). Os resultados indicam uma freqüência aumentada de MN em células vermelhas do sangue periférico de *A. bimaculatus* coletadas nos Sítios 1 e 2, quando comparadas com o respectivo controle negativo (*A. bimaculatus* coletados do Rio Jacarecica). Os resultados desse estudo indicam que o TMN em peixes é uma tecnica útil para a detecção de contaminates quimicos em ambiente aquático e mostra potencial para o monitoramento in situ da qualidade da água. Além disso, os resultados tambem demonstram sensibilidade diferencial de *A. bimaculatus* e *H. malabaricus* quanto à indução de MN.

## PALAVRAS - CHAVE

*Astyanax bimaculatus*; *Hoplias malabaricus*; Rio Japaratuba; Rio Jacarecica; Genotoxicidade; Água doce



## **ABSTRACT**

In situ investigations of the effects of mutagenic pollutants (environmental monitoring) have increasingly used bioindicators, and fish often have been used in these studies as sentinel organisms. In the present study, we have used the piscine micronucleus test (MNT) as an in situ biological indicator of chemical contamination in two fresh water fish species (*Astyanax bimaculatus* and *Hoplias malabaricus*). The fish were collected in the Japarutuba River (Sergipe, Brazil) in an area impacted by a petrochemical industrial complex (sites 1 and 2) which indirectly contributes treated effluent (produced waters – PW) to the river. Responses in fish from these sites were compared to fish from a clean reference site (Jacarecica River - Sergipe, Brazil). The results indicated an enhanced frequency of micronuclei (MN) in peripheral blood erythrocytes of *A. bimaculatus* collected at site 2 from the Japarutuba River when compared to their respective negative control (*A. bimaculatus* collected at Jacarecica River). *A. bimaculatus* collected at site 1 and *H. malabaricus* collected at sites 1 and 2 from the Japarutuba River did not have a significant increase in MN. The results of this study indicate that the piscine MNT is a useful in vivo technique for the detection of chemical contaminants in the aquatic environment and shows potential for in situ monitoring of water quality. Nevertheless, the results also demonstrated differential sensitivity of *A. bimaculatus* and *H. malabaricus* to the induction of MN.

## **KEYWORDS**

*Astyanax bimaculatus*; *Hoplias malabaricus*; Japarutuba River; Jacarecica River; Genotoxicity; River water

## INTRODUCTION

Aquatic environments, such as rivers, are a depository of different types of anthropogenic discharges that contain unknown substances and complex mixtures. A wide range of the waste material from human activities, e.g. domestic waste, municipal wastewaters, agricultural runoff and industrial effluents, are potential sources pollutants and can lead to the contamination of surface and subsurface waters [Watanabe et al., 2002, Andrade et al., 2004]. Recent studies reveal that both the fresh and sea water in many countries, especially in Brazil, have been contaminated with genotoxic compounds [Kataoka et al., 2000; Avishai et al., 2003; Rajaguru et al., 2003; Saotome and Hayashi, 2003; Andrade et al., 2004; Baršienė et al., 2004; Horn et al., 2004; Kilemade et al., 2004; Amaral et al., 2005].

The discharge of substances into the aquatic environment affects all levels of biological organization. The physiological effects on the biota may appear after some hours or even decades [Everaarts et al., 1998]. Environmental contaminants cause a cascade of effects in wildlife from the molecular level to the population level. Genotoxic chemicals affect DNA and can lead to somatic or heritable mutations. Most of these mutations are likely to be sublethal, but the implications for the long-term survival of populations inhabiting impacted areas can be profound [Bickham, 2002]. Recently, van der Oost et al. [2003] discussed the wide array of bioaccumulation markers and biomarkers that are used to demonstrate exposure to and effects of environmental contaminants in relation to their utility for environmental risk assessment.

The Japarutuba River basin is localized in the State of Sergipe, SE, Brazil. It is 124 km in length (1,734.94 Km<sup>2</sup> basin total), covering an area of 8.4% of the State, with a flow rate of 10.6 m<sup>3</sup>/sec. It indirectly receives produced water (PW) from a petrochemical industrial complex. PW, also known as wastewater, oil field brine or formation water, is a high-salinity by-product resulting from oil and gas production [Woodall et al., 2003]. Gray [2002] and Hylland [2003] in reviews of a book entitled "Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water" by Jerry M. Neff, indicate that the offshore oil and gas industry discharges large volumes of PW into marine ecosystems around the world. PW is basically water associated with oil- or gas-bearing formations, which is then separated from oil or gas on the platform and reinjected or discharged. The main contaminants in PW are mono- and polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAHs), alkylphenols, metals (arsenic, barium, cadmium, iron, manganese, lead, zinc and mercury) and various process chemicals (e.g. corrosion inhibitors, antiscaling agents and H<sub>2</sub>S inhibitors). The composition of PW varies widely between fields and the environmental impacts are not well known. It is very difficult to identify specific chemicals as producing a genotoxic response in environmental samples of PWs because few compounds are present at high concentrations.

Toxic petroleum hydrocarbons found in oilfield PWs have increasingly become a major environmental problem facing the U.S. and the world oil and gas industry. Uncontrolled releases into the environment using outdated and inefficient technological control systems and methods have continually put surface and ground water environments at risk [Tellez et al., 2004]. Rarely, the more abundant substances cause genotoxic activity [Horn et al., 2004]. Polychlorinated biphenyls and PAHs are found in aquatic biota, but the concentrations in the water are generally low. Nevertheless, due to their lipophilic properties, these chemicals can accumulate in the fat stores of animals [Belpaene et al., 1997]. PAHs and heavy metals are ubiquitous contaminants of natural environments and many of them are potent mutagens and carcinogens [Minissi et al., 1998; Telli-Karakoç et al., 2001; Cestari et al., 2004; Baird et al., 2005].

Biomonitoring is defined as the systematic use of biological responses to assess environmental changes, usually due to anthropogenic causes [Buss et al., 2003]. Monitoring the aquatic environment is an important activity to prevent aquatic pollution caused by chemical contamination [Saotome and Hayashi, 2003]. The micronucleus assay in fish [Hooftman and de Raat, 1982; Hose et al., 1987] is a useful *in vivo* technique for genotoxicity testing and shows potential for monitoring of water quality. The endpoint is well characterized and can be easily recognized [Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Baršienė et al., 2004]. The technique has been used extensively under *in situ* [Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996; Rodriguez-Cea et al., 2003; Andrade et al., 2004; Buschini et al., 2004] and laboratory conditions [Nepomuceno et al., 1997; Masuda et al., 2004].

Micronuclei (MN) derive from chromosomal fragments and whole chromosomes lagging behind in anaphase. So, the micronucleus test (MNT) can be used to show both clastogenic and aneugenic effects [Norppa and Falck, 2003]. The clastogenic effects of chemical and physical agents on fish cells, with emphasis on the induction of MN in teleosts, and a summary of the various techniques that have been used for the analysis of MN in fish, were reviewed by Al-Sabti and Metcalfe [1995].

In the present study, we have assessed the quality of water impacted by effluents from a petrochemical industry complex using of the piscine MNT. MN were evaluated in the peripheral blood of two fish species, *A. bimaculatus* and *H. malabaricus*. The two fish species were chosen because they are native to this area and widely distributed throughout South America. One of them (*A. bimaculatus*) lives at the river surface, and the other (*H. malabaricus*) lives at the river bottom. Previous investigations using *A. bimaculatus* and *H. malabaricus* for screening the clastogenic effects of xenobiotics indicate that these fish represent good experimental models for genotoxicity studies [Matsumoto and Cólus, 2000; Cestari et al., 2004; Ferraro et al., 2004; Porto et al., 2005]. The results obtained in the present study, however, demonstrate differential sensitivity of *A. bimaculatus* and *H. malabaricus* to the induction of MN, indicating that the two species differ in their ability to serve as sentinels for the in situ biomonitoring of freshwater ecosystems.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection sites and sampling

Adult specimens of the freshwater fish *A. bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), popularly known as *lambari*, and *H. malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes, Erythrinidae), popularly known as *traíra*, were collected at sampling locations in two different areas along the Japaratuba River (northeast Brazil, 10°42'47.53''S 36°59'18.76''W), impacted by contaminants to different degrees (site 1 and site 2, located near Pirambu). In addition, fish were collected from the Jacarecica River, near Povoado de Candeias, a reference site expected to be pristine (clean). The sampling sites are shown in **Figure 1**.

Fish sampling was carried out in March 2003, and water samples were collected at the same time according to Vargas et al. [1993] and Amaral et al. [2005]. Analyses for pH, dissolved oxygen (DO) and metal content performed on these samples are shown in **Table I**.

### Chemical analysis

Water samples were analyzed for heavy metals (Fe, Al, Pb, Cd, Cr) by atomic absorption spectrometry. All analyses were performed in the Laboratories of the Chemical Institute of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

### The micronucleus test (MNT)

The assay was performed essentially as described by Nepomuceno et al. [1997]. Blood was obtained from each animal through gill puncture, and peripheral blood smears were immediately made on a minimum of two grease-free clean slides, fixed in absolute methanol for 15 min, and air-dried. On the following day, the slides were stained with Giemsa diluted 1:20 in sodium phosphate buffer, pH 6.8, for 10 min.

### **Micronucleus frequency**

2,000 erythrocytes from each of two slides/animal (4,000 total), were scored under 1000 X magnification to determine the frequency of micronucleated cells. Coded and randomized slides were scored using blind review by a single observer. The frequency of MN/animal was expressed per 1000 cells (‰).

### **Statistical analysis**

The fish was used as the experimental unit for all statistical analyses. Micronucleus data were not normally distributed; therefore, differences between fish collected in sites 1 and 2 from Japaratuba River compared to fish from the Jacarecica River first were evaluated by a nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by pair-wise comparisons using the nonparametric Mann-Whitney U-test. The level of significance for all tests was set at  $\alpha = 0.05$ . SPSS 12.0 for PCs (SPSS, Chicago, IL) was used for statistical analyses.

## RESULTS

The mean total weights ( $\pm$ SD) of *A. bimaculatus* and *H. malabaricus* collected at both sites 1 and 2 along the Japaratuba River and the Jacarecica River site (the clean reference site) were, respectively,  $6.91 \pm 4.56$  g,  $6.53 \pm 4.24$  g and  $7.55 \pm 4.58$  g for *A. bimaculatus* and  $61.03 \pm 20.73$  g,  $76.95 \pm 38.71$  g and  $34.57 \pm 21.48$  g for *H. malabaricus*. The mean total lengths ( $\pm$ SD) *A. bimaculatus* and *H. malabaricus* collected at sites 1 and 2 along the Japaratuba River and the Jacarecica River site were, respectively,  $72.68 \pm 18.66$  mm,  $72.05 \pm 13.04$  mm and  $77.75 \pm 11.83$  mm for *A. bimaculatus* and  $172.00 \pm 19.44$  mm,  $197.71 \pm 27.96$  mm and  $145.40 \pm 28.96$  mm for *H. malabaricus*. Analysis of the weight/length data for both species collected at site 1 on the Japaratuba River compared to samples from the Jacarecica River indicated that there were no significant differences (*U*-test,  $P > 0.05$ ). Also the weight and length of *A. bimaculatus* collected at site 2 on the Japaratuba River were not difference from Jacarecica River fish (*U* test,  $P > 0.05$ ). However, the weight and length of *H. malabaricus* from site 2 differed significantly (*U* test  $P < 0.05$ ) compared to fish of the same species from the Jacarecica River.

The mean micronucleus frequencies ( $\pm$ SD) for *A. bimaculatus* collected in the Japaratuba River (sites 1 and 2) and the Jacarecica River were, respectively,  $1.80 \pm 3.05$ ,  $1.42 \pm 1.77$  and  $0.42 \pm 1.16$ . The micronucleus frequencies of *A. bimaculatus* collected from site 1 were not significantly different from the micronucleus frequencies of *A. bimaculatus* collected from the Jacarecica River reference site (*U* test,  $P = 0.763$ ); however, the micronucleus frequency for *A. bimaculatus* collected at site 2 was significantly higher than the micronucleus frequency of *A. bimaculatus* collected from the reference site (*U* test,  $P = 0.031$ ) (Table II).

The micronucleus frequencies for *H. malabaricus* collected at sites 1 and 2 were not significantly different from the negative control (*H. malabaricus* collected from the Jacarecica River) (*U* test,  $P > 0.7$ ) (Table II).

## DISCUSSION

The two rivers used in this study were chosen because they exhibited generally good (Jacarecica) and poor (Japaratuba) overall water quality. Although it was not the intention of the study to characterize the genotoxins present in the Japaratuba River, some chemical analyses were performed, such as pH, dissolved oxygen (DO) and metal content (**Table I**). The only difference observed between the sampling and reference sites was the elevated aluminium concentration in the Japaratuba River samples. According to Horn et al. [2004] the chemical composition of pollutants in areas under impact of petrochemical plants is complex and not fully understood, resulting in multiple interactions between the biotic and abiotic components, generating synergistic, antagonistic and/or toxic effects.

Although the number of fish used in the experiment as well as their variable sizes may constitute a limitation in the research, data analysis of weight and length with respect to species collected in polluted sites (Japaratuba River, sites 1 and 2) yielded significant differences only for *H. malabaricus* collected at site 2 as compared to samples from the Jacarecica River. *H. malabaricus* captured in these polluted sites did not have higher micronucleus frequencies than those caught in Jacarecica River, so this factor does not appear to influence the overall micronucleus frequencies in the fish that were sampled.

For each animal, blood was obtained through gill puncture. The main advantage of this procedure is that the test animals need not be killed to obtain the sample, and, when necessary, sequential samples can be obtained from the same individuals [Nepomuceno et al., 1997].

Interspecific differences in xenobiotic metabolism, DNA repair and cell proliferation in the target organ are factors that may affect the sensitivity of fish species to genotoxicity [Al-Sabti and Metcalfe, 1995]. Therefore, micronucleus frequencies may vary according the species of fish sampled. For example, in laboratory studies, *Salmo trutta* was more sensitive to toxic heavy metals (Hg, Cu, Zn, Cd) than *Phoxinus phoxinus* [Sanchez-Galan et al., 1999] and more sensitive than *P. phoxinus* and *Anguilla anguilla* to cyclophosphamide (CP), colchicine and cadmium chloride. *Tilapia rendalli* was more sensitive than *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* to CP and mitomycin C [Grisolia and Starling, 2001; Palhares and Grisolia, 2002]. On the other hand, in situ surveys of wild freshwater ecosystems with different levels of pollution showed that *P. phoxinus* and *A. anguilla* captured in polluted sites did not have higher micronucleus frequencies than those



caught in clean rivers systems, whereas MN were induced in *S. trutta* inhabiting polluted sites [Rodriguez-Cea et al., 2003].

The freshwater fish *H. malabaricus* lives at the river bottom, where sediments probably concentrate pollutants under conditions of decreasing water level. It has been described as one of the few resilient native fishes in highly impacted lake systems [Dergam et al., 2002]. The unexpected lack of micronucleus induction in *H. malabaricus* observed in this work, combined with the previous reports described above showing differential fish sensitivity, suggests that some fish species are unsuitable for monitoring freshwater ecosystems using the piscine MNT. According to Palhares and Grisolia [2002], micronucleus frequencies may vary significantly, depending on the nature of both the toxic agent and the species, and these differences may be related to the pharmacokinetics of the drugs used and to the speed of the hemopoietic cycle. A decrease in frequency of MN caused by an increase in the exposure period and a higher toxicant concentration, can be explained by the inhibitory effects of the effluents on cell division and the subsequent transit of the affected cells into the peripheral circulation [Das and Nanda, 1986; Nepomuceno et al., 1997]. Also, damaged cells (e.g., cells with MN) tend to be removed from the organism faster than undamaged cells [De Flora et al., 1993].

Discharging very low concentrations of chemicals, such as PAHs and trace metals (e.g., Cu, Zn, Pb, Mn and Fe) into the environment may affect all levels of biological organization, from molecule to ecosystem. The duration of time from the moment of introduction of a contaminant into the environment until the very first (harmful) physiological effects on the biota may vary between hours to decades [Everaarts et al., 1998]. Genotoxic chemicals may cause somatic and/or heritable mutations. Somatic mutations cause cellular damage that can ultimately result in disease. Such stress can reduce viability, survivability, and reproductive success. Heritable effects, such as deleterious germ-line mutations, also produce these effects. Subsequently the genetic makeup of populations might be altered by the reduction of genetic variability, the increase of deleterious alleles, or the fixation of low-frequency alleles as the population becomes adapted to new environmental conditions [Bickham, 2002].

According to Neff's review on "Effects of Contaminants from Oil Well Produced Water in Marine Organisms", nearly all studies show that these contaminants are diluted very rapidly and that toxic concentrations do not occur for metals and occur extremely rarely for organic chemicals. So, "given the rapid rate of dilution and dispersion of most

produced water discharges to the ocean,. most produced waters would be expected to produce minimal adverse biological effects in the receiving water environment” [Gray, 2002]. Nevertheless, it has been suggested that the impact of PWs in shallow semi-enclosed canals and natural bayous may be increased because of depressed flushing rates, high particulate retention (turbidity), and the relatively high organic matter content of the particles; these are all conditions that facilitate the persistence of PAHs and other organic compounds in the water column [Daniels and Means, 1989].

In conclusion, the piscine MNT proved to be a useful in vivo technique for the detection of genotoxic contaminants in Japaratuba River, indicating that it has potential for in situ monitoring of water quality. The results, however, demonstrate differential fish sensitivity, suggesting that some fish species may serve as more sensitive sentinels than others.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade Federal de Sergipe and Universidade Federal de Uberlândia. The authors are grateful to Prof. Dr. Luiz Alfredo Pavanin for water chemical analyses and to Cosme Assis, Damião Assis and Ednalva Santos for technical assistance.

## REFERENCES

- Al-Sabti K, Metcalfe CD. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343, 121-135.
- 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. *Mutat Res* 583, 67-74.
- 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. *Environ Mol Mutagen* 44, 459-468.
- Avishai N, Rabinowitz C, Rinkevich B. 2003. Use of the comet assay for studying environmental genotoxicity: Comparisons between visual and image analyses. *Environ Mol Mutagen* 42, 155-165.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45, 106-114.
- Baršienė, J, Lazutka J, Šyvokienė J, Dedonytė V, Rybakovas A, Bagdonas E, Bjornstad A, Andersen OK. 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environ Toxicol* 19, 365-371.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. 1997. Use of the comet assay and the micronucleus test in fish for biomonitoring of the aquatic environment. *Mutat Res* 379, S130.
- Bickham JW. 2002. Genetic effects of environmental contaminants: From molecules to populations. *Mutagenesis* 17, 552.
- Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Dörr 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. *Mutat Res* 557, 119-129.

Buss DF, Baptista DF, Nessimian JL. 2003. Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water quality programs. *Cad Saúde Pública* 19, 465-473.

Cestari MM, Lemos PMM, Ribeiro CAO, Costa JRMA, Pelletier E, Ferraro MVM, Mantovani MS, Fenocchio AS. 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genet Mol Biol* 27, 270-274.

Daniels CB, Means JC. 1989. Assessment of the genotoxicity of produced water discharges associated with oil and gas production using a fish embryo and larval test. *Mar Environ Res* 28, 303-307.

Das RK, Nanda NK. 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat Res* 175, 67-71.

De Flora S, Viganò L, D'Ágostini F, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Melodia F, Arillo A. 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutat Res* 319, 167-177.

Dergam, JA, Paiva SR, Schaeffer CE, Godinho AL, Vieira F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 25, 379-387.

Everaarts JM, Den Besten PJ, Hillebrand MThJ, Halbrook RS, Shugart LR. 1998. DNA strand breaks, cytochrome P-450-dependent monooxygenase system activity and levels of chlorinated biphenyl congeners in the pyloric caeca of the seastar (*Asterias rubens*) from the North Sea. *Ecotoxicology* 7, 69-79.

Ferraro MV M, 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. *Genet Mol Biol* 27, 103-107.

Gray JS. 2002. Book review of “Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water” by Jerry M. Neff; Elsevier, 452 pp. *Marine Poll Bull* 44, 1435–1436.

Grisolia CK, Starling FLRM. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat Res* 491, 39-44.

Hooftman RN, De Raat WK. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral-blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* 104, 147-152.

Horn RC, Rocha JAV, Vargas VMF. 2004. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis* 19, 445 – 451.

Hose JE, Cross JN, Smith SG, Diehl D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. *Mar Environ Res* 22, 167-176.

Hylland K. 2003. Book Review: Bioaccumulation in marine organisms – effect of contaminants from oil well produced water. Author: Jerry M. Neff; Elsevier Science, Amsterdam. *J Exp Marine Biol Ecol* 287, 135-137.

Kataoka H, Hayatsu T, Hietsch G, Steinkellner H, Nishioka S, Narimatsu S, Knasmüller S, Hayatsu H. 2000. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the water of the Danube River. *Mutat Res* 466, 27-35.

Kilemade MF, Hartl MGJ, Sheehan D, Mothersill C, van Pelt FNAME, O’Halloran J, O’Brien NM. 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. *Environ Mol Mutagen* 44, 56-64.

Matsumoto FE, Cólus IMS. 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Gen Mol Biol* 23, 489-492.

- Masuda S, Deguchi Y, Masuda Y, Watanabe T, Nukaya H, Terao Y, Takamura T, Wakabayashi K, Kinae N. 2004. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2*H*-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res* 560, 33-40.
- 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. *Mutat Res* 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. *Mutat Res*, 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. *Environ Mol Mutagen* 30, 293-297.
- Norppa H, Falck GC-M. 2003. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18, 221-233.
- Palhares D, Grisolia CK. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol* 25, 281-284.
- Porto JIR, Araujo CSO, Feldberg E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environ Res* 97, 287-292.
- Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ Mol Mutagen* 41, 85-91.

Rodriguez-Cea A, Ayllon F, Garcia-Vazquez E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol Environ Safety* 56, 442–448.

Sanchez-Galan S, Linde AR, Garcia-Vazquez E. 1999. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicol Environ Safety* 43, 301-304.

Saotome K, Hayashi M. 2003. Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality. *Mutagenesis* 18: 73 – 76.

Somerville HJ, Bennett D, Davenport JN, Holt MS, Lynes A, Mahieu A, McCourt B, Parker JG, Stephenson RR, Watkinson RJ, Wilkinson TG. 1987. Environmental effect of produced water from North Sea oil operations. *Marine Poll Bull* 18, 549-558.

Tellez GT, Nirmalakhandan N, Gardea-Torresdey JL. 2004. Kinetic evaluation of a field-scale activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield-produced water. *Environ Progress* 24, 96-104.

Telli-Karakoç F, Gaines AF, Hewer A, Phillips D. 2001. Differences between blood and liver aromatic DNA adduct formation. *Environ Int* 26, 143-148.

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13, 57-149.

Vargas, VMF, Motta, VEP, Henriques, JAP. 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat Res* 319, 31-45.

Watanabe T, Takahashi Y, Takahashi T, Nukaya H, Terao Y, Hirayama T, Wakabayashi K. 2002. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. *Mutat Res* 519, 187–197.

Woodall DW, Rabalais NN, Gambrell RP, DeLaune RD. 2003. Comparing methods and sediment contaminant indicators for determining produced water fate in a Louisiana estuary. *Marine Poll Bull* 46, 731–740.



**Table I.** Chemical characterization of water samples collected in March 2003 in two sites (1 and 2) of the Japaratuba River (at surface and bottom) and the Jacarecica River (only at surface).

Sampling site	Depth	Temperature (°C)	pH	DO Mg/l	Metal concentration (ppm)				
					Fe	Al	Pb	Cd	Cr
Japaratuba (site 1)	S	30.5	7.6	8.05	0.10	0.91	<0.03	<0.01	<0.01
	B	30.5	7.5	7.87	0.13	<0.2	<0.03	<0.01	<0.01
Japaratuba (site 2)	S	30.5	7.5	9.50	0.09	0.45	<0.03	<0.01	<0.01
	B	30.0	7.6	9.29	0.10	0.45	<0.03	<0.01	<0.01
Jacarecica	S	30.0	7.9	7.90	0.10	<0.2	<0.03	<0.01	<0.01

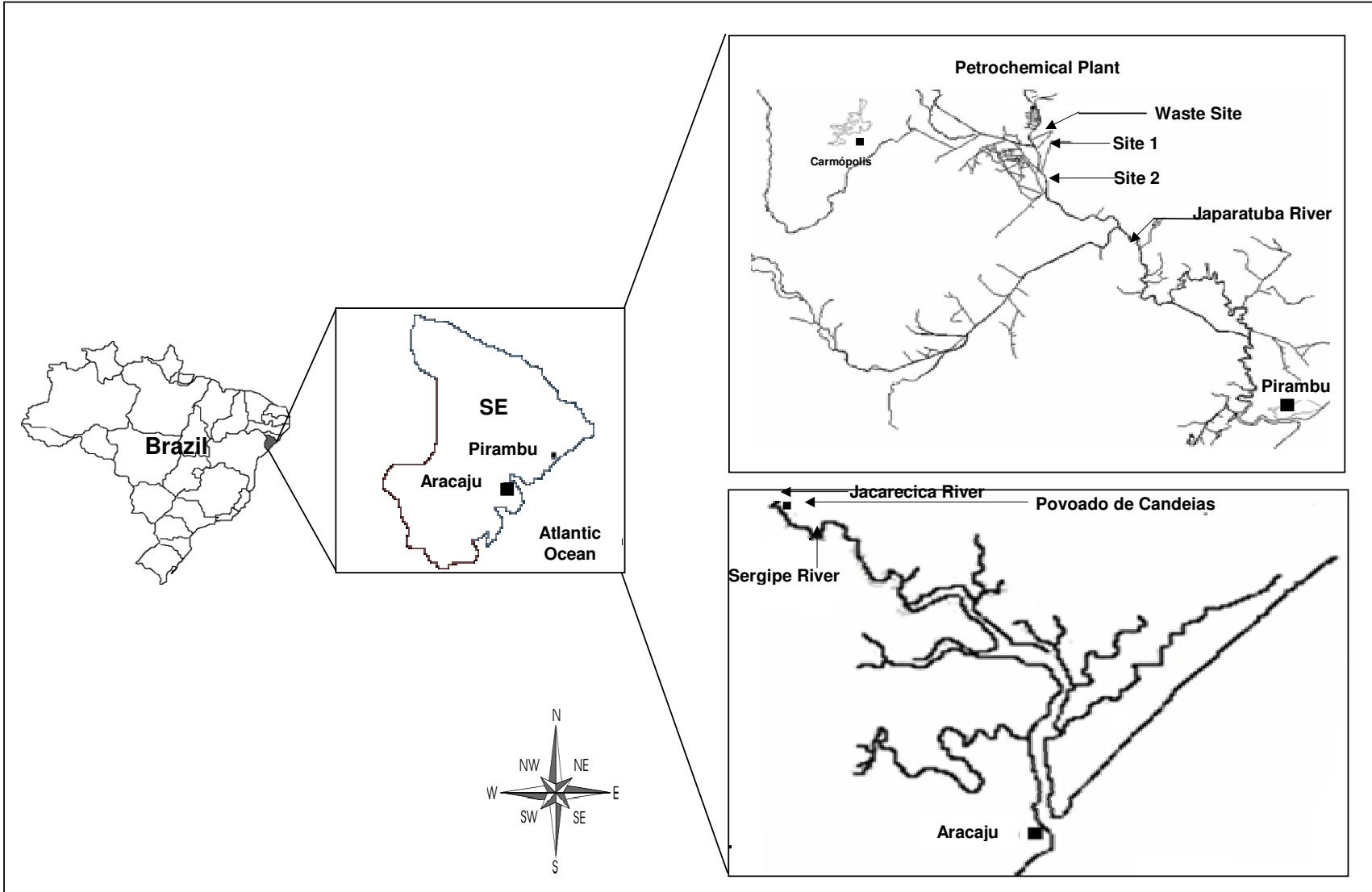
S = surface water; B = bottom water; < = lower than.

**Table II.** Frequency of Micronucleated Cells (TMN, ‰) in Peripheral Erythrocytes of *Astyanax bimaculatus* and *Hoplias malabaricus* collected in Jacarecica River (reference) and the Japaratuba River (sites 1 and 2, experimental)

Sampling locations	N	Total cells	TMN (‰)	Micronuclei
				Mean ± SD
<b>Jacarecica River</b>				
<i>A. bimaculatus</i>	12	48000	5 (0.104)	0.42 ± 1.16
<i>H. malabaricus</i>	10	40000	4 (0.100)	0.40 ± 0.52
<b>Japaratuba River (Site 1)</b>				
<i>A. bimaculatus</i>	15	60000	28 (0.466)	1.80 ± 3.05
<i>H. malabaricus</i>	04	16000	2 (0.125)	0.50 ± 0.58
<b>Japaratuba River (Site 2)</b>				
<i>A. bimaculatus</i>	19	76000	31 (0.408)	1.42 ± 1.77*
<i>H. malabaricus</i>	07	28000	3 (0.107)	0.43 ± 0.79

Significantly different from the control according to the *U* test, with the level of significance set at  $\alpha = 0.05$ .

**Figure 1.** Map of Brazil with Sergipe State and geographic location of the Jacarecica and Japarutuba River hydrographic region and diagram of the collection sites.



## **CAPITULO II**

The Drosophila Wing Spot Test to Assess the Impact of Pollution on the  
Japaratuba River in Brazil

(2006)  
(manuscrito)

## **The Drosophila Wing Spot Test to Assess the Impact of Pollution on the Japaratuba River in Brazil**

Silmara de Moraes Pantaleão<sup>1,2</sup>, Ayda Vera Alcântara<sup>1</sup>, José do Patrocínio Hora Alves<sup>3</sup>, Luiz Alfredo Pavanin<sup>4</sup>, Ulrich Graf<sup>5</sup>, Alexandre Azenha Alves de Rezende<sup>2</sup>, Bruno Lassmar Bueno Valadares<sup>2</sup>, Edson José Fragiorge<sup>2</sup>, Neila Coelho de Souza<sup>2</sup>, Zaira da Rosa Guterrez<sup>2</sup> and Mário Antônio Spanó<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão (Estado de Sergipe – SE), Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, (Estado de Minas Gerais – MG), Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Química Analítica Ambiental, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão (Estado de Sergipe – SE), Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, (Estado de Minas Gerais – MG), Brazil

<sup>5</sup>Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland

**Running title:** Genotoxicity of water and sediment samples from Japaratuba River

\*Corresponding author address: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil. Tel.: +55 34 32182505.

E-mail address: [HYPERLINK "mailto:maspano@ufu.br" maspano@ufu.br](mailto:maspano@ufu.br)

**Funded by:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Universidade Federal de Uberlândia

Universidade Federal de Sergipe

## RESUMO

O Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* foi aplicado para avaliar a genotoxicidade de amostras de águas de superfície (S) e fundo (F) e de sedimento coletados em 2 sítios (sítios 1 e 2) do Rio Japarutuba (Sergipe, Brasil), em uma área impactada por uma indústria petroquímica que descarta indiretamente efluente tratado (água de produção) no rio. Os testes genotóxicos foram baseados em duas coletas, realizadas em Março (estação seca) e Julho (estação chuvosa) de 2003. As frequências de manchas mutantes encontradas nos tratamentos com água não diluída e amostras de sedimento foram comparadas com frequências observadas em água e sedimento do Rio Jacarecica, considerado, de início, um sítio de referência, e com os controles negativos (água ultra pura). Os resultados indicaram que o Rio Jacarecica não pode ser classificado como livre de poluição. Assim, para a avaliação estatística, os resultados foram comparados com os controles negativos correspondentes (água ultra pura). Todas as amostras de água coletadas em março de 2003 foram genotóxicas. Em julho de 2003, as respostas positivas foram restritas às amostras de água coletadas nos Sítios 1 B e 2 S, do cruzamento ST. As genotoxinas encontradas nestas amostras interagem diretamente com o DNA de células somáticas, produzindo mutações cromossômicas e/ou de ponto e recombinação somática. As frequências de manchas encontradas nas moscas MH, das amostras de julho foram consideravelmente menores que as registradas em março, atestando o efeito sazonal. Nas amostras de sedimento só houve resposta genotóxica no Sítio 1 (março e julho) e do Rio Jacarecica (março). As genotoxinas nestas amostras também apresentaram ação direta sobre o DNA, produzindo mutação somática e recombinação. As descobertas deste estudo indicam que o Teste da Mancha da asa de *Drosophila* é uma técnica útil para estudos *in vivo* para a detecção de contaminantes químicos em ambientes aquáticos e que este ensaio é um instrumento potencial para o monitoramento da qualidade da água.

## PALAVRAS-CHAVE

***Drosophila melanogaster*; Rio Japarutuba; Rio Jacarecica; Genotoxicidade; SMART**



## **ABSTRACT**

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) of *Drosophila melanogaster* was applied to assess the genotoxicity of surface (S) and bottom (B) water and sediment samples collected from two sites (Sites 1 and 2) in the Japaratuba River (Sergipe, Brazil), in an area impacted by a petrochemical industrial complex that indirectly discharges treated effluent (produced water - PW) into the river. The genotoxicity tests were based on two samplings taken in March (dry season) and July (rainy season) of 2003. Mutant spot frequencies found in treatments with raw water and sediment samples were compared with frequencies observed in surface water and sediment samples taken from a clean reference site (the Jacarecica River in Sergipe, Brazil) and in negative (ultra pure water) controls. The results indicated that the Jacarecica River cannot be classified as pristine. Hence, for purposes of statistical evaluation, the results were compared with the corresponding negative controls. All the water samples collected in March 2003 were genotoxic. In July 2003, the positive responses were restricted to water samples collected from Sites 1 B and 2 S in the ST cross. The genotoxins found in these samples interacted directly with the DNA of the somatic cells, producing point and/or chromosomal mutation and mitotic recombination. The spot frequencies found in the July samplings were considerably lower than those recorded in March, attesting to the seasonal effect. Sediment proved genotoxic only in samples collected from Site 1 (March and July) and from the Jacarecica River (March). The genotoxins in these samples also acted directly with the DNA, producing somatic mutation and recombination. The findings of this study indicate that the *Drosophila* wing spot test is an useful *in vivo* technique for the detection of chemical contaminants in aquatic environments and that this assay is a potential instrument for monitoring water quality.

## **KEYWORDS**

*Drosophila melanogaster*; Japaratuba River; Jacarecica River; Genotoxicity; SMART

## INTRODUCTION

Water is a convenient and versatile solvent often utilized to carry waste products away from production and discharge sites. Unfortunately, these waste products are often toxic and their presence can seriously degrade the habitat of the receiving river, lake, harbor or stream [White and Rasmussen, 1998]. Sediments are sinks for particle-sorbed contaminants in aquatic systems and can serve as reservoirs of toxic contaminants, representing a continual threat to the health and viability of aquatic biota [Chen and White, 2004].

The Japaratuba River, located in the state of Sergipe (SE), Brazil, indirectly receives PW (produced water, wastewater, oil field brine or formation water) from an industrial petrochemical complex. PW is a highly saline by-product deriving from the production phase of oil and gas recovery, which is separated from oil or gas on the platform and reinjected or discharged. The main contaminants in PW are mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylphenols, metals (arsenic, barium, cadmium, iron, manganese, lead, zinc and mercury) and various process chemicals (e.g., corrosion inhibitors, antiscaling agents and H<sub>2</sub>S inhibitors). The composition of PW varies widely between fields and its environmental impacts are not well known. It is very difficult to identify specific chemicals as producing a genotoxic response in environmental samples of PWs because few compounds are present at high concentrations [Woodall et al., 2003; Gray, 2002; Hylland, 2003].

PW materials may be dispersed widely by currents, volatilized into the atmosphere and adsorbed by naturally occurring particles, and can settle on the bottom or be metabolized by naturally occurring benthic and pelagic bacteria and other organisms. The impact of PW discharge on the receiving ecosystem depends on the rates and balances of these various dispersion, removal and degradation processes [Burns et al., 1999]. The effects of PW discharges on sediment contamination, benthic communities and bioaccumulation potential depend on the volume of the discharge, the chemical characterization of the discharge, and the physiography and hydrography of the receiving environment. PW-derived contamination signals and/or effects on benthic organisms may be minimal near the discharge, but they may also be substantial and extend over great distances from the discharge. PW-derived contaminants may accumulate in the sediments adjacent to and downstream from the discharge point, resulting in high concentrations of hydrocarbons to

depths of 25 to 30 cm in vertical sediment cores. Hydrocarbon contamination resulting from these discharges may also persist through time, both in superficial sediments and vertically into subsurface sediments [Rabalais et al., 1998].

The toxicity of PW may be related to three main groups of components, *i.e.* the organic material (e.g., hydrocarbons and phenols), the heavy metals, and the major ions responsible for the salinity and osmotic properties of water [Strømgren et al., 1995]. In recent years, greater attention has focused on aspects of the environmental toxicity of PW discharges. Water treatment techniques have been developed for the reduction of hydrocarbon and metal concentrations in PW effluents [Scholten et al., 2000]. PAHs and heavy metals are ubiquitous contaminants of natural environments and many of them are potent mutagens [Minissi et al., 1998]. Reviews of the literature on the mutagenicity/genotoxicity of surface waters and aquatic sediments are presented, respectively, by Ohe et al. [2004] and Chen and White [2004] and on aquatic organisms by Jha [2004].

The wing somatic mutation and recombination test (SMART) using *Drosophila melanogaster* has been widely employed in a version based on two wing cell markers. Loss of heterozygosity leads to uncovering and expression of the recessive marker gene(s) in the larval imaginal disk cells, giving rise to clones of mutant cells showing up as mosaic spots on the wings [Graf et al., 1984;1989; Spanó et al., 2001]. The somatic genotoxicity assays in *Drosophila* have proven to be highly sensitive in the detection of environmental genotoxic agents in airborne particulate matter, especially for the PAHs, as well as in aquatic environments [Graf and Singer, 1989; Delgado-Rodriguez et al., 1995; 1999; Amaral et al., 2005] and were considered excellent candidates to be used as biological monitors for genotoxic environmental contaminants [Graf et al., 1996].

In previous investigations, we used the piscine micronucleus test (MNT) in two freshwater fish species (*Astyanax bimaculatus* and *Hoplias malabaricus*) sampled at increasing distances from a petrochemical complex as an *in situ* biological indicator of chemical contamination in Sites 1 and 2 on the Japaratuba River [Pantaleão et al., 2006]. In the present study, we have assessed the quality of water and sediments collected from Sites 1 and 2 using the wing SMART in *D. melanogaster*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemical Compounds and Media**

Ethyl carbamate (urethane) (CAS N° 51-79-6) was supplied by Fluka AG (Buchs, Switzerland), while ultra pure water (18.2 MΩ) was obtained from a MilliQ system (Millipore, Vimodrone, Milan, Italy).

### **Collection sites and sampling**

Water (surface and bottom) and sediment samples were collected at sampling locations in two different areas along the Japaratuba River (northeastern Brazil, 10°42'47.53''S 36°59'18.76''W) impacted by contaminants to different degrees (Site 1 and Site 2, located near Pirambu). In addition, water (surface only) and sediment samples were collected from the Jacarecica River near the Povoado de Candeias, a reference site expected to be pristine. Samples were collected from all the monitoring sites in March (dry season) and July (rainy season) 2003. The sampling sites are shown in **Figure 1**.

### **Water sample collection**

The water samples, which were collected following the procedure outlined by Vargas et al. [1993], were stored for 4 days at 4°C and then divided into aliquots and kept in a freezer at -20°C. At the onset of each collection, pH and dissolved oxygen (DO) of all the samples were analyzed. For additional information, see Pantaleão et al. (2006).

### **Sediment sample collection and preparation**

Sediment samples were collected according to Vargas et al. [2001] and Chen and White [2004], homogenized and air-dried for long-term storage in an opaque container at 4°C. The genotoxicity testing of sediment was conducted on whole sediments. Fine materials were separated by sieving to minimize the variability of results due to changes in particle size composition. A portion of sediment sample was mixed with mashed potato flakes (1:2) (Yoki; Yoki Alimentos S. A., São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil).

## Chemical analysis

Water and sediment samples were analyzed for heavy metals (Fe, Al, Pb, Cd, Cr) by atomic absorption spectrometry. All the analyses were performed in the laboratories of the Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

## Strains and crosses

Three *D. melanogaster* strains were used for the SMART wing assay: (i) *multiple wing hairs* strain having the genetic constitution  $y; mwh\ j$ ; (ii) *flare-3* strain with the genetic composition  $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ l(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$ ; and (iii) *ORR; flare-3* strain genetically constituted of  $ORR; flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ l(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$ . The latter strain carries chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon R(R) line [Dapkus and Merrell, 1977], which is characterized by an increased level of cytochromes P-450 [Hällström and Blanck, 1985; Saner et al., 1996]. The genetic markers *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) and *flare-3* ( $flr^3$ , 3-38.8) are located on the left arm of chromosome 3. Two crosses were carried out: (1) Standard (ST) cross, where  $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ l(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$  females were mated with  $y; mwh\ j$  males [Graf et al., 1989]; and (2) High bioactivation (HB) cross, where  $ORR; flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ l(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$  females were mated with  $y; mwh\ j$  males [Graf and van Schaik, 1992]. The latter cross is highly sensitive to promutagens and procarcinogens due to the increased level of cytochromes P-450 present in the  $ORR; flr^3/TM3, Bd^S$  strain. Both crosses produced experimental larval progeny comprising: (i) marker-heterozygous (MH) flies ( $mwh\ +/+ flr^3$ ) with phenotypically wild-type wings; and (ii) balancer-heterozygous (BH) flies ( $mwh\ +/+ TM3, Bd^S$ ) with phenotypically serrate wings.

## Larval Feeding

Eggs were collected from the two crosses over an 8-hr period bred in culture flasks containing an agar-agar base (3% w/v) topped with a layer of fermenting live baker's yeast supplemented with sucrose. Third instar larvae were collected and transferred to glass vials containing 1 g mashed potato flakes hydrated with 5 mL of the water samples.

Negative (ultra pure water) and positive (10 mM urethane) controls were included in the two experiments. Larvae were allowed to feed on the medium until completion of their larval life (~ 48 hr). The experiments were carried out at 25°C and 60-70% relative humidity. Additional details on the feeding techniques are given by Graf et al. (1984) and Spanó et al. (2001).

Hatched adult flies were collected and stored in 70% ethanol. The wings of MH flies were mounted on slides in Faure's solution (30 g gum arabic, 20 ml glycerol, 50 g chloral hydrate, 50 ml water) and examined for spots under a compound microscope at 400 X magnification. The wings of BH flies were mounted and analyzed whenever a previous positive response was obtained in the MH progeny. Single spots (mostly *mwh* but occasionally also *flr<sup>3</sup>*) can result from point mutations, chromosomal aberrations or recombination. Twin spots (*mwh* and *flr<sup>3</sup>*) are produced by mitotic recombination between the proximal marker *flr<sup>3</sup>* and the centromere of chromosome 3. Only *mwh* single spots can be recovered on the wings of BH flies. These spots are all due to mutational events because recombinational events are suppressed in inversion-heterozygous cells with the multiply-inverted *TM3* balancer chromosome [Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón and Graf, 1995].

### **Data Evaluation and Statistical Analysis**

The data were evaluated according to the multiple-decision procedure of Frei and Würzler [1988; 1995]. The frequencies of each type of mutant clone per fly were compared with the concurrent negative control series using the conditional binomial test of Kastenbaum and Bowman [1970], with significance levels set at  $\alpha = \beta = 0.05$ .

### **RESULTS**

Tables I and II summarize, respectively, the results obtained with the ST and HB crosses after chronic treatment of larvae with raw water samples collected in March and July 2003. Negative (ultra pure water) and positive (10 mM urethane) controls were included simultaneously in each experiment. The spot data for small single spots, large single spots and twin spots, together with the total number of spots, are given for both MH and BH progeny. For purposes of statistical evaluation, the results were compared with the corresponding negative controls.

The water samples collected in March 2003 from Sites 1 and 2 (surface and bottom) and

from the Jacarecica River were genotoxic and produced mitotic recombination in MH flies of the ST cross (Table I). About 44% and 29% of the genotoxic effects elicited by Site 1 surface and bottom samples, respectively, were of mitotic recombinational origin.

Likewise, Site 2 surface and bottom samples elicited, respectively, 68.5% and 40.4% and the Jacarecica sample 47% of mitotic recombination. In the HB cross (Table II), positive outcomes were observed only in MH flies treated with water samples from Site 1/bottom, Site 2/surface, and the Jacarecica River. The outcomes from MH flies compared with those from BH flies indicate that these samples exert recombinagenic activity representing, respectively, 79%, 51%, and 68% of the total genotoxic effect observed.

The water samples collected in July 2003 were genotoxic in MH flies of the ST cross (Table I) only for Site 1/bottom and Site 2/surface, which produced, respectively, 62.5 and 92.5% of mitotic recombination. No statistically significant differences were found in any of the categories of spots in the HB cross (Table II) after chronic treatment of larvae with all the water samples.

The positive control urethane showed a statistically significant induction of spots in both crosses and demonstrated the high bioactivation effect (1.43 spots with *mwh* clone per fly in the ST cross vs. 10.85 spots with *mwh* clone per fly in the HB cross for March treatments; and 1.42 spots with *mwh* clone per fly in the ST cross vs. 5.36 spots with *mwh* clone per fly in the HB cross for July treatments).

The size distributions for single spots recorded for MH wings after chronic treatment of larvae with water samples collected in March 2003 from Sites 1 and 2 (surface and bottom) and the Jacarecica River are plotted in **Figure 2A and B** for the two crosses. The distributions for water samples collected in July 2003 are plotted in **Figure 2C and D**.

Tables III and IV summarize, respectively, the results of the ST and HB crosses after chronic treatment of larvae with sediment samples collected in March and July 2003.

Because all the treatments with water and sediment samples were done simultaneously, for both crosses the negative and positive controls are the same as shown in Tables I and II. For purposes of statistical evaluation, the results were compared with the corresponding negative controls.

The sediment samples collected in March 2003 from Site 1 and from the Jacarecica River were genotoxic and produced mitotic recombination in MH flies of the ST cross (Table III). About 63% and 61% of the genotoxic effects elicited, respectively, by Site 1 and the Jacarecica River were of mitotic recombinational origin. These positive responses were

limited to the ST cross, since there was no genotoxicity observed in the HB cross (Table IV) which may indicate that the genotoxins in these samples interacted directly with the DNA of the somatic cells.

The sediment sample collected from Site 1 in July 2003 was genotoxic in the ST and the HB cross and produced mitotic recombination in MH flies (Tables III and IV).

Furthermore, a significant mutational response was observed in the HB cross, since the frequencies of the small single spots and consequently of the total spots were significantly increased also in BH flies (Table IV). No statistically significant differences in any of the categories of spots were observed in other sediment treatments.

The size distributions for single spots recorded for MH wings after chronic treatment of larvae with sediment samples collected in March 2003 from Sites 1 and 2 and the Jacarecica River are plotted in **Figure 3A and B** for the two crosses. The distributions for sediment samples collected in July are plotted in **Figure 3C and D**.



## DISCUSSION

Recent studies in our laboratory used the piscine MNT to assess the impact of chemical contamination at Sites 1 and 2 in the Japaratuba River [Pantaleão et al., 2006]. The present study extends these observations, assessing pollution in the Japaratuba and Jacarecica Rivers based on the *Drosophila* wing spot test. The two rivers investigated here were chosen based on institutional studies conducted in the area of these river basins, which demonstrated generally good (Jacarecica) and poor (Japaratuba) overall water quality.

The chemical composition of pollutants in areas impacted by petrochemical plants, which is complex and not fully understood, causes multiple interactions between biotic and abiotic components, generating synergistic, antagonistic and/or toxic effects [Horn et al., 2004]. Chemical characterizations of industrial waste materials rarely provide an adequate assessment of the genotoxicity and potential hazard of these materials. Bioassays, on the other hand, do not require prior information about chemical compositions and can effectively assess the genotoxicity of complex waste materials [Claxton et al., 1998]. Although the genotoxins present in the Japaratuba River were not thoroughly characterized in this study, a few chemical analyses were performed, such as pH, dissolved oxygen (DO) and metal content. The only difference found between the sampling and reference sites was the high aluminum concentration in the Japaratuba River samples; these concentrations also exceeded the maximum limits established by Brazilian law. A more detailed chemical characterization of water samples collected at Sites 1 and 2 of the Japaratuba River (surface and bottom) and the Jacarecica River (only at the surface) is given in Pantaleão et al. [2006].

The ST and HB crosses were used in parallel; therefore, the larvae derived from both crosses were treated under identical conditions. All the water and sediment samples were tested in two independent experiments. The data were pooled after ascertaining the absence of significant differences between repetitions.

Mutant spot frequencies found in treatments with raw water and sediment samples should be compared with frequencies observed in surface water and sediment samples taken from the Jacarecica River, which was considered a clean reference site. Nevertheless, high frequencies of mutant spots were observed in samples from the Jacarecica River, indicating that it must be receiving some kind of anthropogenic discharge and, in the present study,

failed to qualify as pristine. Hence, for purposes of statistical evaluation, the results were compared with the corresponding negative (ultra pure water) controls.

The results obtained in the ST cross with water samples collected in March 2003 from Sites 1 and 2 (surface and bottom) and from the Jacarecica River indicate that the genotoxins present in all these samples interacted directly with the DNA of the somatic cells. The frequency of spots induced in MH individuals gives a ranking order for their respective genotoxic effectiveness,  $2S > 1B > 2B > 1S = \text{Jacarecica}$ . With the exception of Site 2 surface water, all water samples exert at best a weak genotoxic activity as reflected in the frequencies of total spots. This genotoxicity can be attributed to point and/or chromosomal mutation as well as mitotic recombination. In the HB cross, the ranking order of the samples for their genotoxic effectiveness was  $2S > 1B > \text{Jacarecica}$  based on the frequency of total spots. A considerable proportion of induced homologous recombination was observed in these tests.

The water samples collected in July 2003 presented positive responses restricted to the ST cross, since they were not genotoxic in the HB cross. The ranking order observed in the ST cross was  $1B > 2S$ , indicating that genotoxins interacted directly with the DNA of the somatic cells. Furthermore, these tests gave a rather high proportion of recombinogenic activity.

Similar results were obtained by Amaral et al. [2005], who observed that genotoxins present in surface waters collected from the Caí River (Rio Grande do Sul, Brazil), impacted by untreated urban discharges, induced both mutational and recombinational events, although the increases observed were attributed mainly to the occurrence of homologous recombination. The effects were only observed in the ST cross, demonstrating that genotoxins interact directly with the DNA of somatic cells.

The data given in Tables I and II indicate that the spot frequencies recorded for MH flies from the July (rainy season) samplings were considerably lower than those from the March (dry season) samples, demonstrating seasonal effects and the interference of sample concentration on the genotoxic response. Watanabe et al. [2002] also demonstrated seasonal fluctuation of the mutagenicity of samples of water from the Mawatari, Asuwa and Kitsune Rivers in Fukui, Japan.

Results from the study of sediment samples collected in March 2003 from Site 1 and from the Jacarecica River showed that the positive responses were restricted to the ST cross, since they were not genotoxic in the HB cross. The genotoxins interacted directly

with the DNA of the somatic cells and had a considerable recombinagenic activity. Nevertheless, sediment samples collected in July 2003 from Site 1 indicated the presence of directly- and indirectly-acting genotoxins as positive results were also obtained in the HB cross. There is a link between genomic mutation and homologous recombination with carcinogenicity. Some of these genetic alterations may play a primary role in carcinogenesis, but they are more likely to be involved in secondary and subsequent steps of carcinogenesis by which recessive oncogenic mutations are revealed [Bishop and Schiestl, 2002].

PW-derived contaminants may accumulate in the sediments and persist through time in superficial and subsurface sediments. The contamination of superficial sediment and its effects on macrofauna were still seen two years after discharge. Contaminants, including weathered petroleum-related hydrocarbons and creosote, were accumulated vertically in higher concentrations in the sediments (up to 10 cm) and detected nine years after discharge (Rabalais et al., 1998). Biodegradation of PW changes its chemical composition and generally reduces its toxicity. Acute toxicity should be expected only in the immediate vicinity of the outlets while, at a distance (*i.e.* > 2 km), toxic effects are considered negligible [Strømgren et al., 1995]. The damaging effects of PW on young fish are likely to be largely restricted to areas very close to platforms [Stephens et al., 2000]. Considering that Sites 1 and 2 are located at increasing distances from the petrochemical plant, in the present study, contrary to what we expected, our water samples showed a more marked genotoxic effect at Site 2/surface and Site 1/bottom. This allows us to hypothesize that prior to and/or during the period of collection, the industrial petrochemical complex may have decreased or stopped discharging PW into the river. Therefore, the genotoxicity observed in water samples from Site 2/surface may be due to chemical elements and/or particulate material from PW-derived contaminants accumulated in the sediment of Site 1 (a type of scoria), which may have been suspended and dragged to Site 2 by the river's flow. This hypothesis is supported by the negative responses we obtained from water samples collected at Site 1/surface and the positive responses obtained from sediment and water samples collected at Site 1/bottom during the rainy season, when the river flows more rapidly. The findings of genotoxicity in the present investigation are congruous with the results of an earlier study, which indicated an enhanced frequency of micronuclei (MN) in peripheral red blood cells of *A. bimaculatus* collected at Sites 1 and 2 [Pantaleão et al., 2006].

In conclusion, this paper is one of the first to use bioassays for the detection of genotoxic contaminants (complex mixtures) in Japaratuba and Jacarecica Rivers, indicating that these rivers are contaminated with unidentified chemicals that induce homologous recombination which is related to carcinogenicity. Further research is needed to discern the genotoxic potential of sediment extracts and specific compounds present in water samples collected from both rivers and its relationship with seasonality, providing data that may prove useful to maintaining the health and viability of biota.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade Federal de Sergipe and Universidade Federal de Uberlândia. The authors are grateful to Cosme Assis, Damião Assis and Ednalva Santos for technical assistance.

## REFERENCES

- 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. *Mutat Res* 583:67-74.
- Bishop AJR, Schiestl RH. 2002. Homologous recombination and its role in carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2:75-85.
- Burns KA, Codi S, Furnas M, Heggie D, Holdway D, King B, Mcallister F. 1999. Dispersion and fate of produced formation water constituents in an Australian Northwest shelf shallow water ecosystem. *Mar Pollut Bull* 38:593-603.
- Chen G, White PA. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat Res* 567:151-225.
- Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ. 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res* 410:237-243.
- Dapkus D, Merrell DJ. 1977. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87:685-697.
- Delgado-Rodriguez A, Ortíz-Martello 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-Martello 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.

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

Frei H, Würgler FE. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.

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

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, Singer D. 1989. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (wing spot test): Effects of extracts of airborne particulate matter from fire-exposed and non fire-exposed building ventilation filters. *Chemosphere* 19:1094-1097.

Graf U, Spanó MA, Rincón JG, Abraham SK, Andrade HH. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Afr Newslett on Occup Health and Safety* 6 (Suppl 1):9-13.

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.

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

Gray JS. 2002. Book review of “Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water” by Jerry M. Neff; Elsevier, 452 pp. *Mar Pollut Bull* 44:1435–1436.

- Guzmán-Rincón J, Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM, Corkum LD, Guzmán-Rincón J. (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. New York: Plenum Press. p 169-181.
- Hällström I, 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.
- Horn RC, Rocha JAV, Vargas VMF. 2004. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis* 19:445 – 451.
- Hylland K. 2003. Book Review: *Bioaccumulation in marine organisms – effect of contaminants from oil well produced water*. Author: Jerry M. Neff; Elsevier Science, Amsterdam. *J Exp Marine Biol Ecol* 287:135-138.
- Jha AN. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat Res* 552:1-17.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527-549.
- 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. *Mutat Res* 420:77-84.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 567:109-149.
- 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. *Environ Mol Mutagen* 47 (in press). Available at: HYPERLINK "



bin/fulltext/112223744/PDFSTART" <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112223744/PDFSTART>.

Rabalais NN, Smith LE, Henry Jr. CB, Roberts PO, Overton EB. 1998. Long-term effects of contaminants from OCS-produced water discharges at Pelican Island Facility, Louisiana a. OCS Study MMS 98-0039. U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, New Orleans, Louisiana, 88 pp ( HYPERLINK "http://www.mms.gov/itd/abstracts/98-0039a.html" <http://www.mms.gov/itd/abstracts/98-0039a.html>, accessed in January 09, 2006).

Saner C, Weibel B, Würgler FE, Sengstag C. 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. Environ Mol Mutagen 27:46-58.

SCHOLTEN MCTH, KARMAN CC, HUWER S. 2000. Ecotoxicological risk assessment related to chemicals and pollutants in off-shore oil production. Toxicol Lett 112-113, 283-288.

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.

Stephens SM, Frankling AC, Stagg RM, Brown JA. 2000. Sub-lethal effects of exposure of juvenile turbot to oil produced water. Mar Pollut Bull 40:928-937.

Strømgren T, Sørstrøm SE, Schou L, Kaarstad I, Aunaas T, Brakstad OG, Johansen Ø. 1995. Acute toxic effects of produced water in relation to chemical composition and dispersion. Mar Environ Res 40:147-169.

Vargas VMF, Migliavacca SB, Melo AC, Horn RC, Guidobono RR, Ferreira ICFS, Pestana MHD. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. Mutat Res 490:141-158.

Vargas VMF, Motta VEP, Henriques JAP. 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat Res* 319:31-45.

Watanabe T, Takahashi Y, Takahashi T, Nukaya H, Terao Y, Hirayama T, Wakabayashi K. 2002. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. *Mutat Res* 519:187-197.

White P A, Rasmussen J B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat Res* 410:223–236.

Woodall DW, Rabalais NN, Gambrell RP, DeLaune RD. 2003. Comparing methods and sediment contaminant indicators for determining produced water fate in a Louisiana estuary. *Mar Pollut Bull* 46:731–740.

**TABLE I.** Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard Cross (ST) after Chronic Treatment of Larvae with Water Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japarutuba River (at Surface and Botton) and from the Jacarecica River (Only at Surface)

Collection	Genotypes	Treatment and sampling site	Depth	Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis <sup>*</sup>				Spots with mwh clone	Frequency of clone formation/10 <sup>5</sup> cells <sup>a</sup>		Recombination (%)
					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		Observed	Control corrected	
March	MH	Urethane		30	1.20 (36)+	0.10 (03)i	0.13 (04)i	1.43 (43)+	43			
		MilliQ		42	0.31 (13)	0.00 (00)	0.05 (02)	0.36 (15)	11	0.53		
		Japarutuba River (Site 1)	S	60	0.58 (35)+	0.07 (04)i	0.02 (01)i	0.67 (40)+	40	1.36	0.83	44.0
			B	60	0.65 (39)+	0.07 (04)i	0.02 (01)i	0.73 (44)+	42	1.50	0.97	29.0
		Japarutuba River (Site 2)	S	60	0.73 (44)+	0.22 (13)+	0.03 (02)i	0.98 (59)+	57	1.94	1.41	68.5
			B	60	0.55 (33)+	0.08 (05)i	0.05 (03)i	0.68 (41)+	40	1.36	0.83	40.4
		Jacarecica River	S	60	0.53 (32)i	0.10 (06)+	0.03 (02)i	0.67 (40)+	39	1.33	0.80	47.0
	BH	MilliQ		30	0.40 (12)	0.03 (01)	b	0.43 (13)	13	0.88		
		Japarutuba River (Site 1)	S	40	0.35 (14)i	0.03 (01)i		0.38 (15)i	15	0.76	-0.12	
			B	40	0.43 (17)i	0.10 (04)i		0.53 (21)i	21	1.07	0.19	
		Japarutuba River (Site 2)	S	40	0.24 (10)-	0.05 (02)i		0.29 (12)-	12	0.61	-0.27	
			B	40	0.33 (13)i	0.08 (03)i		0.40 (16)i	16	0.81	-0.07	
		Jacarecica River	S	40	0.28 (11)-	0.08 (03)i		0.35 (14)-	14	0.71	-0.17	
	July	MH	Urethane		60	1.13 (68)+	0.25 (15)+	0.03 (02)i	1.42 (85)+	85		
MilliQ				55	0.29 (16)	0.07 (04)	0.04 (02)	0.40 (22)	21	0.78		
Japarutuba River (Site 1)			S	40	0.40 (16)i	0.05 (02)i	0.00 (00)i	0.45 (18)-	17	0.87	0.09	
			B	40	0.60 (24)i	0.13 (05)i	0.00 (00)i	0.73 (29)+	25	1.28	0.50	62.5
Japarutuba River (Site 2)			S	40	0.45 (18)i	0.20 (08)i	0.05 (02)i	0.70 (28)+	26	1.33	0.55	92.5
			B	33	0.58 (19)i	0.06 (02)i	0.00 (00)i	0.64 (21)i	21	1.30	0.52	
Jacarecica River			S	40	0.35 (14)i	0.13 (05)i	0.03 (01)i	0.50 (20)i	19	0.97	0.19	
BH		MilliQ		40	0.10 (04)	0.00 (00)	b	0.10 (04)	04	0.20		
		Japarutuba River (Site 1)	B	38	0.18 (07)i	0.05 (02)i		0.24 (09)i	09	0.48	0.28	
		Japarutuba River (Site 2)	S	40	0.05 (02)i	0.00 (00)i		0.05 (02)i	02	0.10	-0.10	

\* Statistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988, 1995] for comparison with corresponding control: -, negative; i, inconclusive; +, positive (P<0.05); *m*, minimal risk multiplication factor for the assessment of negative results; <sup>a</sup> Clone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) gives an estimative of formation frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments (Frei and Würzler, 1988); b, balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr*<sup>3</sup> mutation.

**TABLE II.** Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation Cross (HB) after Chronic Treatment of Larvae with Water Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River (at Surface and Botton) and from the Jacarecica River (Only at Surface)

Collection	Genotypes	Treatment and sampling site	Depth	Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis <sup>c</sup>				Spots with mwh clone	Frequency of clone formation/10 <sup>5</sup> cells <sup>a</sup>		Recombination (%)
					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		Observed	Control corrected	
March	MH	Urethane		40	8.63 (345)+	1.40 (56)+	0.83 (33)+	10.85 (434)+	427			
		MilliQ		38	0.50 (19)	0.03 (01)	0.00 (00)	0.53 (20)	20	1.07		
		Japaratuba River (Site 1)	S	50	0.64 (32)i	0.14 (07)i	0.02 (01)i	0.80 (40)i	40	1.63	0.56	
			B	50	0.84 (42)+	0.18 (09)+	0.04 (02)i	1.06 (53)+	53	2.17	1.10	79.0
		Japaratuba River (Site 2)	S	50	0.96 (48)+	0.18 (09)+	0.08 (04)i	1.22 (61)+	61	2.50	1.43	51.0
		B	50	0.62 (31)i	0.10 (05)i	0.02 (01)i	0.74 (37)i	37	1.51	0.44		
	Jacarecica River	S	50	0.66 (33)i	0.16 (08)	0.08 (04)i	0.90 (45)+	45	1.84	0.77	68.0	
	BH	MilliQ		40	0.58 (23)	0.08 (03)	b	0.65 (26)	26	1.33		
		Japaratuba River (Site 1)	B	40	0.20 (08)-	0.03 (01)i		0.23 (09)-	9	0.46	-0.87	
		Japaratuba River (Site 2)	S	40	0.55 (22)-	0.05 (02)i		0.60 (24)-	24	1.22	-0.11	
Jacarecica River		S	38	0.26 (10)-	0.03 (01)i		0.29 (11)-	11	0.59	-0.74		
July	MH	Urethane		50	4.96 (248)+	0.28 (14)+	0.10 (05)i	5.36 (268)+	268			
		MilliQ		55	0.58 (32)	0.11 (06)	0.05 (03)	0.82 (45)	41	1.52		
		Japaratuba River (Site 1)	S	40	0.55 (22)-	0.23 (09)i	0.05 (02)i	0.83 (33)-	28	1.43	-0.09	
			B	40	0.63 (25)-	0.10 (04)i	0.03 (01)i	0.75 (30)-	30	1.53	0.01	
		Japaratuba River (Site 2)	S	40	0.45 (18)-	0.13 (05)i	0.00 (00)i	0.58 (23)-	22	1.12	-0.40	
			B	40	0.45 (18)-	0.13 (05)i	0.03 (01)i	0.85 (34)-	34	1.74	0.22	
		Jacarecica River	S	60	0.53 (32)-	0.17 (10)i	0.03 (02)i	0.73 (44)-	39	1.33	0.19	

\* Statistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988, 1995] for comparison with corresponding control: -, negative; i, inconclusive; +, positive ( $P < 0.05$ ); *m*, minimal risk multiplication factor for the assessment of negative results; <sup>a</sup> Clone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) gives an estimative of formation frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments (Frei and Würzler, 1988); b, balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr*<sup>3</sup> mutation.

**TABLE III.** Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard Cross (ST) after Chronic Treatment of Larvae with Sediment Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River and from the Jacarecica River

Collection	Genotypes	Treatment and sampling site	Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis*				Spots with mwh clone	Frequency of clone formation/10 <sup>5</sup> cells <sup>a</sup>		Recombination (%)
				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		Observed	Control corrected	
March	MH	MilliQ	42	0.31 (13)	0.00 (00)	0.05 (02)	0.36 (15)	11	0.53		
		Japaratuba River (Site 1)	40	0.58 (23)+	0.15 (06)+	0.03 (01)i	0.75 (30)+	30	1.53	1.00	63.0
		Japaratuba River (Site 2)	40	0.33 (13)i	0.15 (06)+	0.03 (01)i	0.50 (20)i	20	1.02	0.49	
		Jacarecica River	27	0.70 (19)+	0.15 (04)+	0.04 (01)i	0.89 (24)+	24	1.82	1.29	61.0
	BH	MilliQ	30	0.40 (12)	0.03 (01)	b	0.43 (13)	13	0.88		
		Japaratuba River (Site 1)	32	0.25 (08)-	0.03 (01)i		0.28 (09)-	9	0.57	-0.31	
		Jacarecica River	40	0.25 (10)-	0.10 (04)i		0.35 (14)-	14	0.71	-0.17	
July	MH	MilliQ	55	0.29 (16)	0.07 (04)	0.04 (02)	0.40 (22)	21	0.78		
		Japaratuba River (Site 1)	25	0.60 (15)+	0.24 (06)i	0.04 (01)i	0.88 (22)+	22	1.80	1.02	81.0
		Japaratuba River (Site 2)	28	0.29 (08)i	0.11 (03)i	0.00 (00)i	0.39 (11)-	10	0.73	-0.05	
		Jacarecica River	40	0.35 (14)i	0.13 (05)i	0.03 (01)i	0.50 (20)i	19	0.97	0.19	
	BH	MilliQ	40	0.10 (04)	0.00 (00)	b	0.10 (04)	4	0.20		
		Japaratuba River (Site 1)	40	0.15 (06)i	0.03 (01)i		0.18 (07)i	7	0.35	0.15	

\* Statistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988, 1995] for comparison with corresponding control: -, negative; i, inconclusive; +, positive (P<0.05); *m*, minimal risk multiplication factor for the assessment of negative results; <sup>a</sup> Clone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) gives an estimative of formation frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments (Frei and Würzler, 1988); b, balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr<sup>3</sup>* mutation.

**TABLE IV.** Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation Cross (HB) after Chronic Treatment of Larvae with Sediment Samples Collected in March and July 2003 from Two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River and from the Jacarecica River

Collection	Genotypes	Treatment and sampling site	Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis <sup>*</sup>				Spots with mwh clone	Frequency of clone formation/10 <sup>5</sup> cells <sup>a</sup>		Recombination (%)
				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		Observed	Control corrected	
March	MH	MilliQ	38	0.31 (13)	0.00 (00)	0.05 (02)	0.36 (15)	11	0.59		
		Japaratuba River (Site 1)	45	0.73 (33)i	0.09 (04)i	0.02 (01)i	0.84 (38)i	36	1.63	1.04	
		Japaratuba River (Site 2)	19	0.68 (13)i	0.21 (04)+	0.00 (00)i	0.89 (17)i	17	1.83	1.24	
		Jacarecica River	37	0.62 (23)i	0.11 (04)i	0.11 (04)i	0.84 (31)i	31	1.71	1.12	
July	MH	MilliQ	55	0.58 (32)	0.11 (06)	0.05 (03)	0.82 (41)	41	1.52		
		Japaratuba River (Site 1)	32	1.13 (36)+	0.19 (06)i	0.06 (02)i	1.38 (44)+	34	2.17	0.65	35.0
		Japaratuba River (Site 2)	31	0.55 (17)-	0.23 (07)i	0.00 (00)i	0.77 (24)-	23	1.52	0.00	
		Jacarecica River	39	0.67 (26)-	0.13 (05)i	0.00 (00)i	0.79 (31)-	28	1.47	-0.05	
	BH	MilliQ	40	0.13 (05)	0.00 (00)	b	0.13 (05)	5	0.25		
Japaratuba River (Site 1)		39	0.59 (23)+	0.10 (04)i		0.69 (27)+	27	1.41	1.16		

\* Statistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988, 1995] for comparison with corresponding control: -, negative; i, inconclusive; +, positive (P<0.05); *m*, minimal risk multiplication factor for the assessment of negative results; <sup>a</sup> Clone frequencies per fly divided by the number of cells examined per fly (48 800) gives an estimative of formation frequencies per cell and per cell division in chronic exposure experiments (Frei and Würzler, 1988); b, balancer chromosome *TM3* does not carry the *flr*<sup>3</sup> mutation.

**Figure 1.** Map of South America with Brazil, Sergipe State and geographic location of the Jacarecica and Japarutuba River hydrographic region and diagram of the sampling sites.

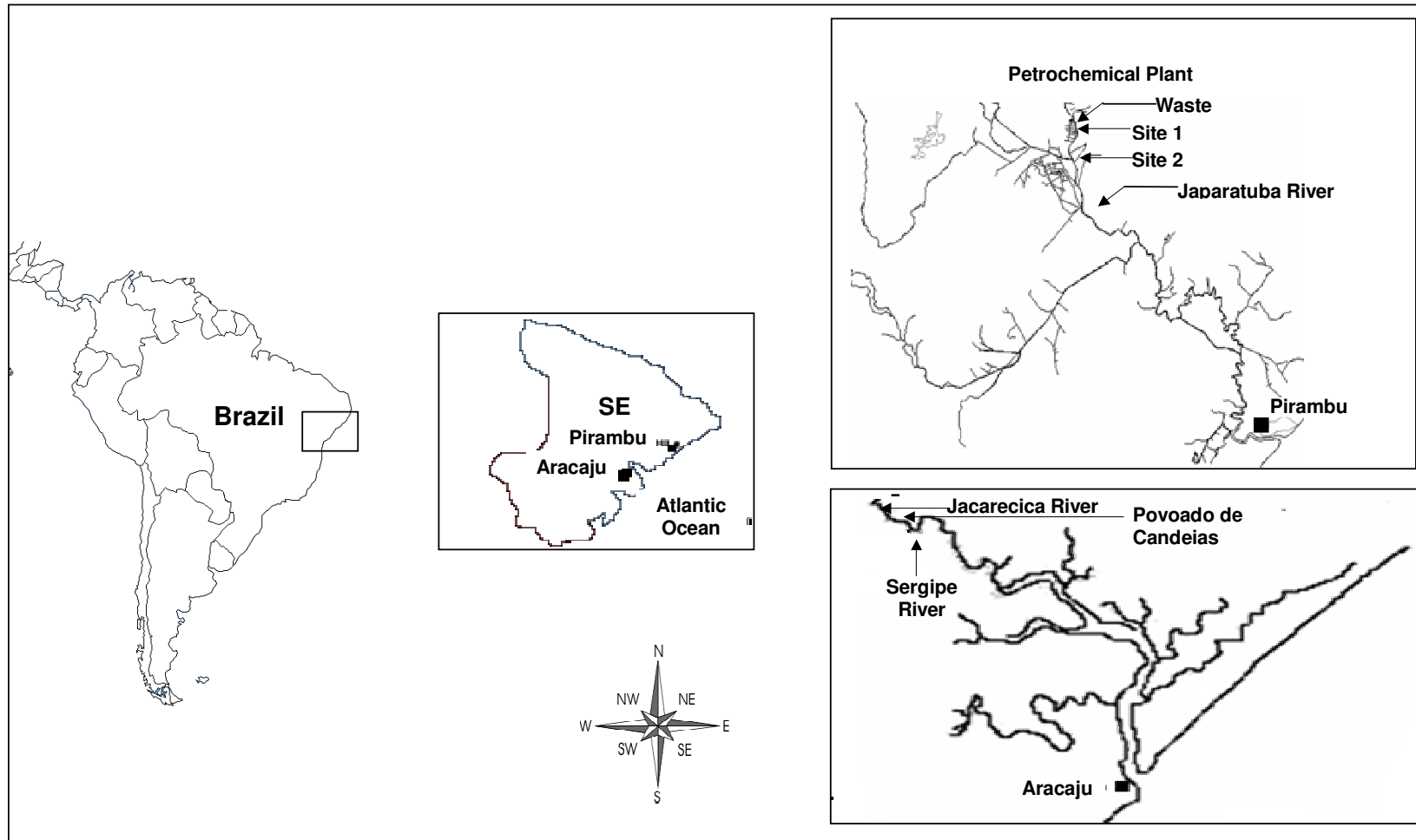


Figure 2. Size distributions for single spots after chronic treatments with water MilliQ and water samples collected in March and July 2003 from two Sites (1 and 2) on the Japaratuba River (at surface and bottom) and from the Jacarecica River (only at surface).

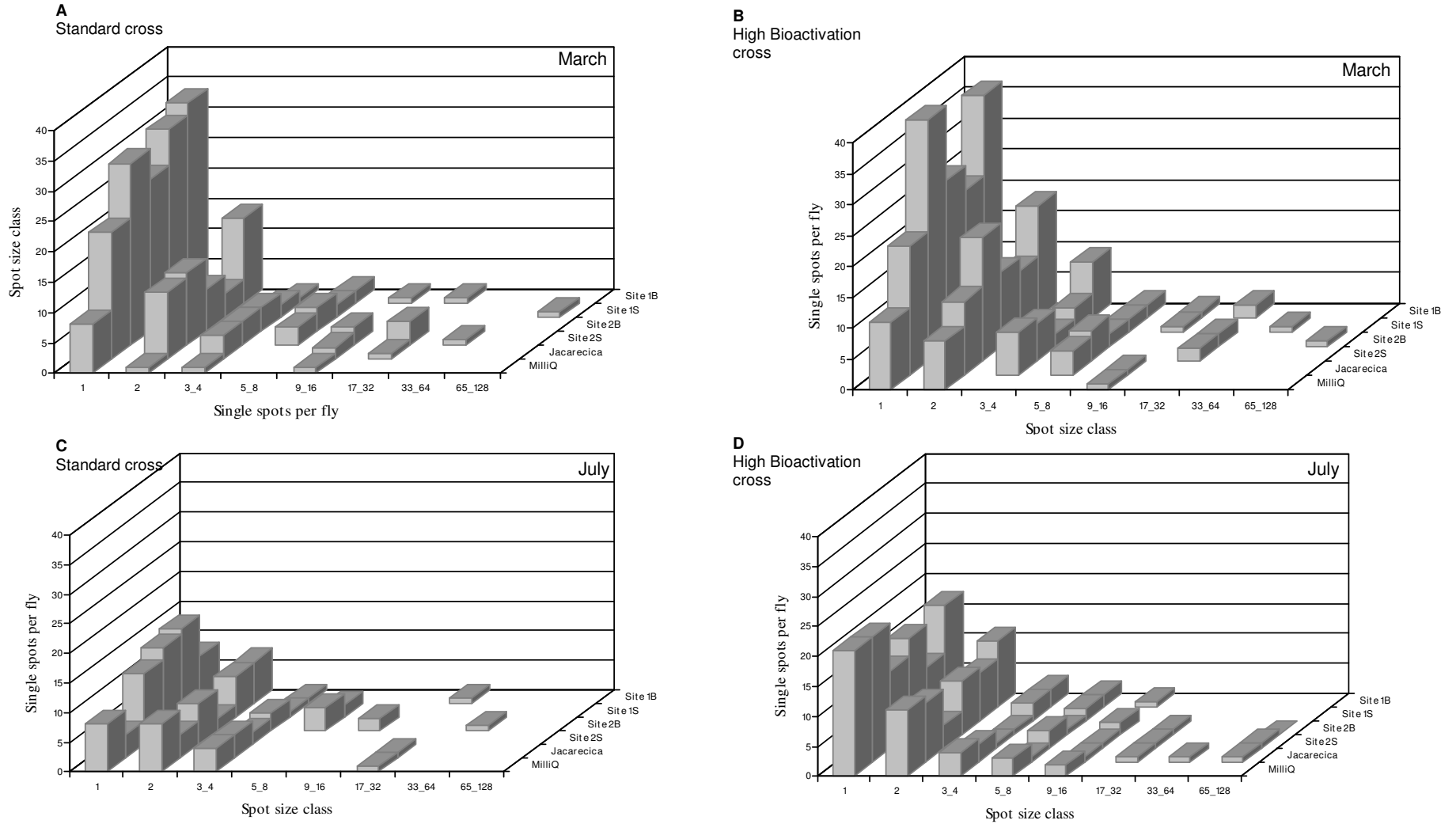
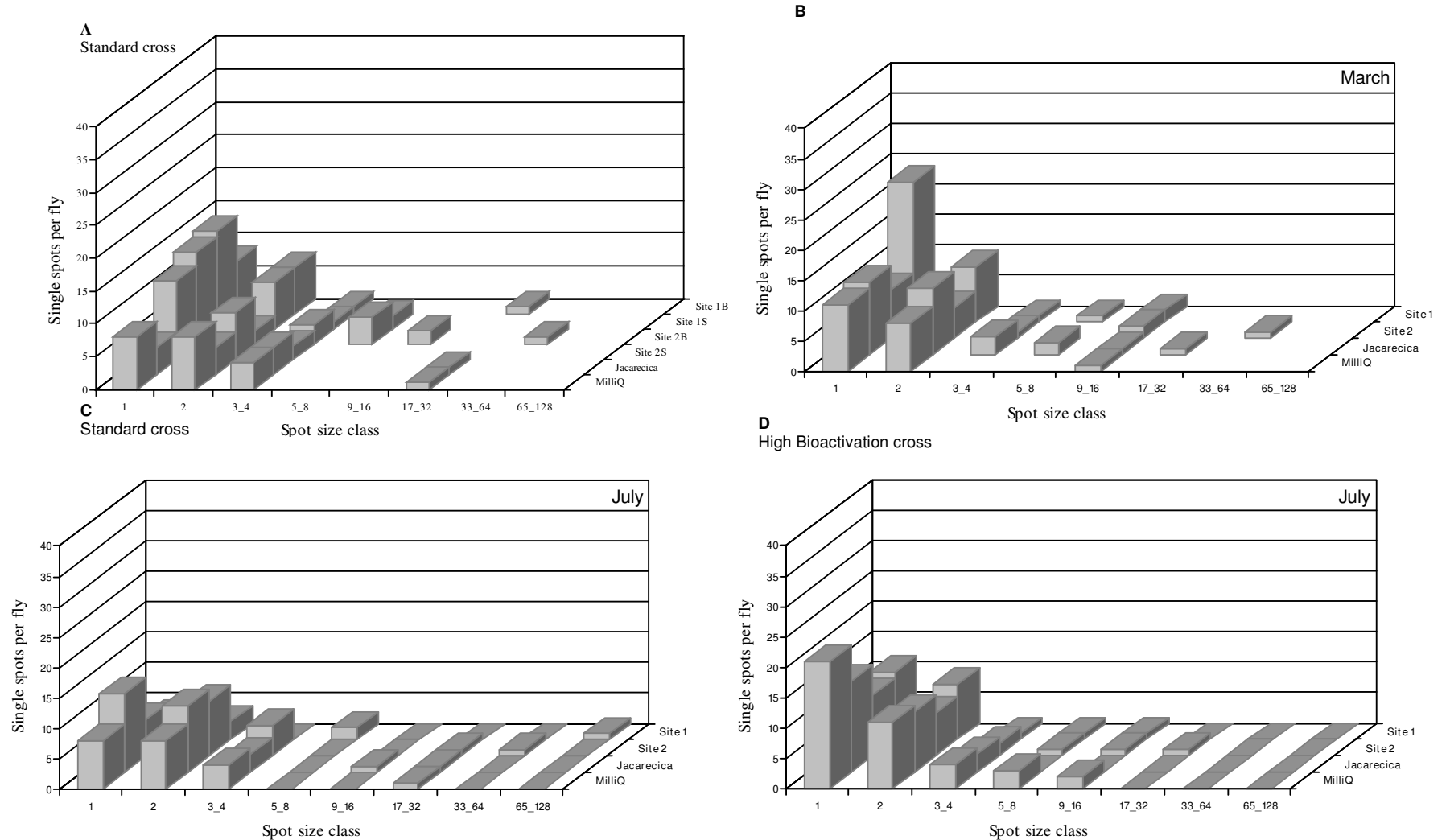




Figure 3. Size distributions for single spots after chronic treatments with sediment samples collected in March and July 2003 from two Sites (1 and 2) on the Japarutuba River and from the Jacarecica River.



### 3. DISCUSSÃO GERAL

Para a região NE do Brasil, a água tem um valor muito especial e sua presença ou ausência, determina o ritmo de vida e a sobrevivência da população, seja no litoral ou interior. A existência de dois períodos sazonais durante o ano (chuva e seca) imprime uma dicotomia na paisagem, que representa o retrato dessa região.

A precipitação pluviométrica varia de 300 a 2.000 mm/ano e a temperatura varia de 20° a 28°C. No entanto, a escassez de recursos hídricos não direciona o controle da qualidade da água por meio de um monitoramento sistemático. Isto reflete a situação do controle dos recursos hídricos no Brasil que, embora possua a maior disponibilidade hídrica do planeta, com 13,8% do deflúvio médio mundial e uma das legislações mais rígidas do mundo, sobre os recursos hídricos, possui programas de monitoramento descontínuos e concentrados nas regiões sudeste e sul do País (WRI, 1998; TUCCI et al., 2001; BUSS et al., 2003).

Grande parte da população brasileira e das atividades industriais está concentrada nas áreas costeiras ou próximas a elas. As atividades de exploração, refino e transporte de petróleo são mais intensas na costa do que em terra. Estudos sobre o impacto de petróleo ou seus derivados têm sido realizados nos últimos anos, utilizando biomarcadores de acumulação e, como espécies sentinela, invertebrados, algas e organismos bênticos (NIPPER, 2000).

No Estado de Sergipe não há nenhum trabalho realizado sobre o impacto genotóxico de AP sobre ambientes aquáticos, além dos apresentados no presente estudo. Essa observação é preocupante, uma vez que seus principais contaminantes são PAHs e metais pesados, muitos deles com propriedades carcinogênicas e mutagênicas comprovadas (MINISSI et al., 1998; TELLI-KARAKOÇ et al., 2001; CESTARI et al., 2004; BAIRD et al., 2005). Mesmo em baixas concentrações, sua descarga no ambiente pode afetar todos os níveis de organização biológica, de moléculas a ecossistemas. O tempo de duração de um contaminante no

ambiente, desde o momento da introdução até a manifestação dos primeiros efeitos fisiológicos (danosos) pode variar de horas a décadas (EVERAARTS et al., 1998).

Do ponto de vista do risco genético para humanos e o significado ecológico para a biota aquática, a determinação da potência e a quantificação de mutágenos/carcinógenos presentes em águas de superfície é um dos mais importantes assuntos.

Avaliações de rotina, do potencial genotóxico de efluentes, pode fornecer a base científica necessária para que governos ou autoridades empreguem medidas eficientes para a regulamentação da descarga de substâncias potencialmente prejudiciais ao ambiente (KOHLPOTH et al., 1999; OHE et al., 2004).

Os dois rios escolhidos para a realização do presente trabalho ilustram, de maneira contrastante, a necessidade de um monitoramento sistemático.

O Rio Jacarecica, considerado de início como sítio de referência (livre de poluição), foi escolhido por estar localizado longe de qualquer atividade industrial e, mais especificamente, do complexo petroquímico em questão. No entanto, a avaliação de amostras de água e sedimento deste rio, por meio do teste da mancha da asa em *D. melanogaster*, indicou que o Rio Jacarecica deve estar recebendo algum tipo de descarga antropogênica. Por essa razão, o mesmo não pôde servir como referência, quando da comparação com os resultados de genotoxicidade de amostras de água e sedimento do Rio Japaratinga. Assim, para efeito de avaliação estatística, todos os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com os respectivos controles negativos (água ultra pura).

De modo contrário, a análise de MN em peixes do Rio Jacarecica não mostrou efeitos de genotoxicidade. As menores freqüências (‰) observadas em *A. bimaculatus* (0,13) e *H. malabaricus* (0,33) estavam de acordo com os resultados citados na literatura, como mostram as freqüências médias de MN de *A. bimaculatus*, da estação de pesca da Universidade Estadual de Londrina (PR, Brasil) e de *H. malabaricus* do Rio Solimões (próximo a Ilha de Marchantaria, Brasil) que foram,

respectivamente, 0,31 (Matsumoto & Cólus, 2000) e 0,06 (Ferraro et al., 2004).

O Rio Japarutuba, por sua vez, exemplifica a falta de monitoramento, com ênfase em biomarcadores de exposição. Ao longo de seu curso não há outra fonte de poluente, como plantações ou usinas de açúcar, por exemplo. Assim, a única fonte crônica de poluição é a AP, descartada em seu leito por mais de trinta anos.

Independentemente de a descarga deste efluente ser atual ou antiga, os efeitos crônicos dos poluentes presentes na AP podem ser constantemente evidenciados. De acordo com declarações da população ribeirinha, há forte alteração no sabor dos peixes e crustáceos (gosto de querosene). Sinais de estresse são evidenciados por meio de alterações morfológicas (erosão das nadadeiras dorsais, exoftalmia e eritema na região dorsal) em diferentes espécies de peixes residentes, como naquelas de origem marinha (pesquisadores da UFS, comunicação pessoal). Em adição, análises físico-químicas revelaram que o sedimento do rio está contaminado com Cu, Pb, Zn e Co.

Embora as genotoxinas presentes no Rio Japarutuba não tenham sido extensivamente caracterizadas neste estudo, algumas análises químicas foram feitas, tais como, pH, oxigênio dissolvido (OD) e conteúdo de metal. A única diferença observada entre as amostras coletadas no Rio Japarutuba e as do sítio de referência foram as elevadas concentrações de alumínio detectadas nas amostras do Rio Japarutuba. As concentrações observadas são maiores que as permitidas pelas leis brasileiras.

De acordo com Horn et al. (2004), a composição química dos poluentes presentes em áreas impactadas por indústria petroquímica é complexa e não bem compreendida, resultando em múltiplas interações entre os componentes bióticos e abióticos, gerando efeitos sinérgicos, antagonistas e/ou tóxicos.

Na avaliação da genotoxicidade por meio do TMN em peixes, o número de peixes usados no experimento, bem como seus tamanhos variáveis, poderiam ter constituído uma limitação na pesquisa. Análises de dados de peso e comprimento, com respeito aos peixes coletados em sítios poluídos

(Rio Japarutuba, Sítios 1 e 2), mantiveram diferenças significativas somente para *H. malabaricus* coletados no Sítio 2, quando comparados com os coletados no Rio Jacarecica. Os peixes *H. malabaricus* capturados nestes sítios poluídos não tiveram freqüências de MN superiores àqueles do Rio Jacarecica. Assim, este fator não interferiu nas freqüências totais de MN observados. Além disso, a relação geral entre a freqüência de MN em *A. bimaculatus* e a proximidade da fonte presumida de poluição suporta a adequação desta espécie para pesquisas de poluição.

Resultados similares foram obtidos em experimentos anteriores feitos em tecidos de guelra e hemócitos de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) coletados nos golfos de Thermaikos e Strymonikos (Grécia). Neste estudo, as freqüências de MN não foram consistentes com o gradiente de poluição e os autores concluíram que seriam necessárias novas pesquisas, para que o seu emprego como organismo sentinela fosse validado (DAILIANIS et al., 2003).

Diferenças interespecíficas relacionadas com o metabolismo de xenobióticos, proficiência em reparo de DNA, e proliferação celular em órgãos alvo, são fatores que podem afetar a sensibilidade de espécies de peixes à genotoxicidade (AL-SABTI & METCALFE, 1995). Portanto, as freqüências de MN podem variar de acordo com as espécies de peixes amostrados (SANCHEZ-GALAN et al., 1999; GRISOLIA & STARLING, 2001; PALHARES & GRISOLIA, 2002; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003).

A falta inesperada de indução de MN em *H. malabaricus*, observada neste trabalho, combinado com os relatos anteriores, descritos acima, mostrando sensibilidade diferencial por peixe, sugere que algumas espécies não são apropriadas para monitoramento de ecossistemas de água doce, por meio do MNT em peixes. De acordo com Palhares & Grisolia (2002), as freqüências de MN podem variar significativamente, dependendo tanto da natureza dos agentes tóxicos, quanto das espécies utilizadas, sendo que estas diferenças podem estar relacionadas à farmacocinética dos agentes químicos utilizados e a velocidade do ciclo hematopoiético. Uma diminuição na freqüência de MN, causada por aumento no período de exposição e a uma maior concentração de agente tóxico, pode ser explicada pelos efeitos

inibidores dos efluentes sobre a divisão celular e ao trânsito subsequente das células afetadas na circulação periférica (DAS & NANDA, 1986; MAJONE et al., 1987; NEPOMUCENO et al., 1997).

De acordo com artigo de revisão sobre os efeitos de contaminantes da AP sobre organismos marinhos, aproximadamente todos os estudos mostram que estes contaminantes são diluídos muito rapidamente, não sendo detectadas concentrações tóxicas de metais, e sua ocorrência é extremamente rara para químicos orgânicos. Assim, dada à rápida taxa de diluição e dispersão da maioria das descargas de AP no oceano, espera-se que a ocorrência de efeitos biológicos adversos no ambiente aquático receptor seja o mínimo possível (GRAY, 2002).

Entretanto, tem sido sugerido que os impactos de AP em canais pouco profundos, semifechados, e baías naturais, podem aumentar por causa do fluxo lento, alta retenção de partículas (turbidez) e o conteúdo relativamente alto de partículas de matéria orgânica em suspensão. Todas essas condições facilitam a persistência de PAHs e outros compostos orgânicos na coluna d'água (DANIELS & MEANS, 1989).

Em conclusão, o MNT em peixes provou ser uma técnica *in vivo* útil para a detecção de contaminantes genotóxicos no Rio Japarutuba, indicando sua potencialidade para monitoramento *in situ* da qualidade da água. Os resultados, contudo, demonstram diferenças interespecíficas com relação à sensibilidade dos peixes, sugerindo que algumas espécies são mais adequadas para servir como organismos sentinelas do que outras. Assim, investigações adicionais são necessárias para determinar se a análise de MN em *H. malabaricus* é um bom bioindicador de genotoxicidade em ambientes de água doce.

As análises de água e sedimento dos Rios Japarutuba e Jacarecica, por meio do SMART com *D. melanogaster*, corroboram os resultados da análise de MN em peixes.

Os cruzamentos ST e HB foram realizados em paralelo. Portanto, as larvas derivadas de ambos os cruzamentos foram tratadas sob idênticas condições. Todas as amostras de água e sedimento foram testadas em

dois tratamentos independentes. Os dados foram agrupados após a conclusão de que não havia diferenças significantes entre as repetições.

As freqüências de manchas mutantes encontradas em tratamentos com amostras de água não diluída e sedimento poderiam ser comparadas com as freqüências observadas em amostras de água de superfície e de sedimento coletadas no Rio Jacarecica, o qual foi considerado como sítio de referência. Entretanto, altas freqüências de manchas mutantes foram observadas em amostras do Rio Jacarecica, indicando que ele deve receber algum tipo de descarga antropogênica. Assim, no presente estudo, o mesmo não pode ser considerado livre de poluição. Desta forma, para propostas de avaliação estatística, os resultados foram comparados com os controles negativos correspondentes (água ultrapura).

Os resultados obtidos no cruzamento ST com amostras de água dos Sítios 1 e 2, coletadas em março de 2003 (na superfície e fundo) e as do Rio Jacarecica indicam que as genotoxinas presentes em todas essas amostras interagem diretamente com o DNA de células somáticas. As freqüências de manchas induzidas em indivíduos MH obedecem a seguinte ordem de classificação de atividade genotóxica:  $2S > 1B > 2B > 1S = \text{Jacarecica}$ . Com a exceção da água de superfície do Sítio 2, todas as amostras de água exerceram efeitos genotóxicos, representados por mutações de ponto e/ou cromossômicas. No cruzamento HB a ordem de classificação de atividade genotóxica foi  $2S > 1B > \text{Jacarecica}$  e o aumento observado envolveu principalmente a ocorrência de recombinação homóloga.

As amostras de água coletadas em julho apresentaram respostas positivas restritas ao cruzamento ST, uma vez que elas não foram genotóxicas no cruzamento HB. A ordem de classificação de atividade genotóxica observada no cruzamento ST foi  $1B > 2S$ , indicando que as genotoxinas interagiram diretamente com o DNA das células somáticas e exerceram principalmente ação recombinogênica, sobre o efeito genotóxico total observado.

Resultados similares foram obtidos por Amaral et al. (2005), que observaram que as genotoxinas presentes em águas de superfície,

coletadas no Rio Caí (Rio Grande do Sul, Brasil), impactado por descargas urbanas não tratadas, induziram tanto eventos mutacionais quanto recombinacionais, embora os aumentos observados fossem atribuídos, principalmente, a ocorrência de recombinação homóloga. Os efeitos foram observados somente no cruzamento ST, demonstrando que as genotoxinas interagem diretamente com o DNA de células somáticas.

As frequências de manchas observadas em indivíduos MH, tratados com amostras de água e sedimento coletados em julho (estação chuvosa), foram consideravelmente mais baixas que aquelas das amostras de março (estação seca), demonstrando efeitos sazonais e a interferência da concentração das amostras sobre a resposta genotóxica. Watanabe et al. (2002) também demonstraram flutuações sazonais na mutagenicidade de amostras de água dos Rios Mawatari, Asuwa e Kitsune em Fukui, no Japão.

Resultados do estudo de amostras de sedimento, coletadas em março de 2003 do Sítio 1 e do Rio Jacarecica mostraram que as respostas positivas estavam restritas ao cruzamento ST, uma vez que eles não foram genotóxicos no cruzamento HB. As genotoxinas interagiram diretamente com o DNA das células somáticas e a maioria dos efeitos genotóxicos foram de origem recombinacional. Entretanto, amostras de sedimento do Sítio 1, coletadas em julho de 2003, indicaram a presença de genotoxinas de ação direta e indireta. A maioria das alterações induzidas pelas genotoxinas de ação direta foi de origem recombinacional, enquanto que nas de ação indireta foi, principalmente, de origem mutacional.

Existe uma estreita correlação entre mutação gênica e recombinação homóloga com a carcinogênese. Algumas destas alterações genéticas podem representar um papel iniciador na carcinogênese, mas eles estão mais provavelmente envolvidos nas etapas secundárias e subseqüentes da carcinogênese, onde mutações oncogênicas recessivas são reveladas (BISHOP & SCHIESTL, 2002).

Contaminantes derivados da AP podem acumular nos sedimentos e persistir através do tempo, tanto em sedimentos de superfície, quanto subsuperficiais. A contaminação de sedimentos superficiais e seus efeitos



sobre a macroinfauna foram observados dois anos após a descarga. Contaminação por hidrocarbonetos petrogênicos e creosoto, acumulados verticalmente em altas concentrações, a uma profundidade de 10 cm dos sedimentos, foi detectada nove anos após a descarga (RABALAIS et al., 1998).

A biodegradação da AP altera sua composição química e geralmente reduz sua toxicidade. A toxicidade aguda seria esperada somente nas proximidades da descarga, enquanto que à certa distância (i.e. > 2 km) os efeitos tóxicos podem ser considerados negligíveis (STRØMGREN et al., 1995). Os efeitos deletérios da AP sobre peixes jovens são restritos às áreas próximas à plataforma (STEPHENS et al., 2000).

Considerando que os Sítios 1 e 2 estão localizados em distâncias crescentes do complexo petroquímico, no presente estudo, ao contrário do que seria esperado, os efeitos genotóxicos mais marcantes foram detectados nas amostras de água da superfície do Sítio 2 e do fundo do Sítio 1. Isto nos permite hipotetizar que antes ou durante os períodos de coleta, deve ter havido interrupção ou diminuição das descargas de AP no Rio Japarutuba. Assim, a genotoxicidade observada em amostras de água de superfície do Sítio 2 devem ser devidas a elementos químicos e/ou material particulado, derivados de contaminantes da AP, acumulados nos sedimentos do Sítio 1, os quais devem ter sido revolvidos e levados para o Sítio 2, pelo fluxo do rio. Esta hipótese é suportada pelas respostas negativas que obtivemos nas amostras de água de superfície coletadas no Sítio 1 e as respostas positivas obtidas do sedimento e água de fundo, coletados no Sítio 1, durante a estação chuvosa, quando o rio flui mais rapidamente.

Os resultados observados na avaliação do impacto genotóxico no Rio Japarutuba, por meio do teste do MN em peixes, são coerentes com os resultados da avaliação da genotoxicidade de amostras de água e sedimento coletados nos Sítios 1 e 2.

Seguindo uma tendência mundial, este trabalho mostrou que a melhor estratégia para avaliação de risco de ambientes impactados está no uso

combinado de diferentes biomarcadores de exposição, com diferentes bioensaios.

À medida que dados químicos, físicos e biológicos se avolumam em todo o mundo, muitas perguntas permanecem sem resposta sobre a exposição aos poluentes. Por isso, a avaliação da saúde ambiental e o impacto da poluição necessitam de uma abordagem interdisciplinar que requer esforços conjuntos de pesquisadores especializados em diferentes áreas (NIPPER, 2000).

A existência de grande quantidade de evidências sobre os efeitos de agentes químicos sobre os mais variados organismos e sobre diferentes compartimentos ambientais (solo, ar, água), aliados aos inúmeros dados epidemiológicos em humanos, uniu a World Health Organization (WHO), a Environmental Protection Agency (EPA) e a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) numa iniciativa inédita de integrar esses dados, com o objetivo de estender o conceito de saúde ambiental a humanos e não humanos, tendo como cenário um ambiente comum (SUTTER, 2005).

#### **4. CONCLUSÃO**

Em conclusão, este trabalho é o primeiro a usar bioensaios para a detecção de contaminantes genotóxicos (misturas complexas) nos Rios Japarutuba e Jacarecica, indicando que estes rios estão contaminados com agentes químicos não identificados, que induzem efeitos mutagênicos, clastogênicos, aneugênicos e, principalmente, recombinagênicos.

Estudos posteriores são necessários para discernir o potencial genotóxico de extratos de sedimentos e compostos específicos presentes nas amostras de água coletadas de ambos os rios, e sua relação com a sazonalidade, fornecendo dados que possam provar ser úteis para a saúde e viabilidade da biota.