

Monitoramento da toxicidade genética associada aos dejetos industriais e urbanos em amostras de água do rio Caí através do Teste SMART

JANAÍNA DIAS GODINHO¹
VIVIANE SOUZA DO AMARAL²
RENATA MEDINA DA SILVA²
MARIA LUÍZA REGULY³
HELOISA HELENA RODRIGUES DE ANDRADE^{3,4}

RESUMO

O rio Caí é utilizado como corpo hídrico recipiente de efluentes industriais e urbanos. Em função disto, foi utilizado o teste SMART para traçar um diagnóstico da genotoxicidade associada a este rio. As coletas foram realizadas nos meses de março, junho e setembro de 1999 em pontos sob influência industrial (km18,6 e km13,6) e urbana (km52, km78 e km80). Os pontos km 18,6 e km 13,6 foram caracterizados como destituídos de ação genotóxica. Por outro lado, as amostras urbanas referentes aos meses de março (km 52, 78 e 80) e setembro (km 52) foram diagnosticadas como indutoras de toxicidade genética. Considerando estes resultados, conclui-se que os prejuízos causados pelos dejetos urbanos podem ser tão ou mais nocivos que os impostos pelos de origem industrial.

Palavras-chaves: SMART, Genotoxicidade, Água, *D. melanogaster*.

¹ Acadêmico do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Aluno de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS

³ Professor do Curso de Biologia/ULBRA

⁴ Professor – Orientador do Curso de Biologia e do PPG de Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (helois@ulbra.br)

ABSTRACT

The Caí river receives large amounts of industrial and urban discharges. In function this, we employed the SMART to evaluate the genotoxicity from this river. The samples were collected in 2 industrial sites (km 18.6 and km 13.6) and in 3 urban sites (km 52, km78 and 80). The monitoring included three collections: March, June and September 1999. The sites km 18.6 and km 13.6 were characterized as destitute of genotoxic action. On the other hand, the points under influence of municipal discharges were genotoxic: km52, 78 and 80 samples collected in march, and km 52 collected in September. Taking into account the results observed, the SMART assay results lead to the conclusion that urban wastes may be as polluting as or even more polluting than industrial ones.

Key words: SMART, Genotoxicity, Water, *D. melanogaster*.

INTRODUÇÃO

O lançamento de efluentes industriais e urbanos nos corpos hídricos impõe um significativo risco aos ecossistemas, não apenas pelo volume de descarga dos dejetos, mas principalmente pela sua composição química. O rio Caí é utilizado como principal fonte de água e corpo hídrico recipiente de efluentes industriais e municipais. Diversas atividades urbanas e industriais vêm sendo intensamente praticadas nas suas margens. As cidades de Montenegro e de São Sebastião do Caí concentram atividades relacionadas, basicamente, com pequenas indústrias. Adicionalmente, nestes dois últimos municípios, os esgotos cloacais são ligados à rede de esgotos pluviais, sendo lançados diretamente nos cursos d'água a eles associados. Desta forma, este é o segmento do rio que mais recebe lançamentos de efluentes de pequenas e grandes indústrias e onde há maior despejo de esgotos domésticos não tratados (FEPAM/GTZ, 1997).

O rio Caí vem sendo alvo de uma série de estudos que procuram identificar a presença de substâncias genotóxicas, especialmente no seu curso final, em função da influência exercida pelo Pólo Petroquímico do Sul. Utilizando o teste

Salmonella/microsoma, como método de triagem, foram obtidas respostas positivas na maioria dos sítios de coleta, evidenciando a presença de substâncias mutagênicas na área de influência do Complexo Petroquímico (VARGAS, MOTTA & HENRIQUES, 1988). Associadas a estas análises foram empregadas técnicas citogenéticas *in vitro* para a avaliação da indução de aberrações cromossômicas, utilizando o método de bloqueio da citocinese (CBMN), em cultura de linfócitos humanos. Esta metodologia foi empregada para a análise dos mesmos pontos anteriormente analisados por VARGAS, MOTTA & HENRIQUES (1988), tendo sido incluído o ponto Km 14,1. Os resultados obtidos revelaram a presença de substâncias com potencial clastogênico e/ou aneugênico em todos os sítios de amostragem (LEMOS & ERDTMANN, 2000).

Em função destas peculiaridades, a utilização de bioensaios capazes de detectar simultaneamente uma ampla gama de lesões, em nível gênico e cromossômico, poderá traçar um diagnóstico mais completo da toxicidade genética associada ao curso inferior do rio Caí. Dentro deste contexto, destaca-se o Teste para Detecção de Mutações e Recombinação em Células Somáticas de

Drosophila melanogaster (SMART), que tem se mostrado uma ferramenta precisa para a detecção do impacto causado por diferentes poluentes aos ecossistemas. Desta forma, o presente trabalho foi delineado no sentido de atingir os seguintes objetivos: (i) avaliar, através do SMART, amostras de água superficial de diferentes pontos do rio Caí, que estão sob influência de efluentes industriais e urbanos; (ii) estimar a sensibilidade e a adequação deste bioensaio como uma ferramenta para o controle da qualidade ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Pontos de Coleta

As amostras foram coletadas nos meses de março, junho e setembro de 1999 em pontos do rio sob influência de dejetos industriais - km 18,6 e km 13,6 - e urbanos - km 52 (Município de Montenegro), km 78 e km 80 (Município de São Sebastião do Caí).

Teste Para Detecção de Mutações e Recombinação Somática (SMART)

Dentre os bioensaios ainda pouco utilizados para avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais, encontra-se o SMART - em células somáticas de *D. melanogaster*. Este teste, além de utilizar um organismo experimental eucarioto, com estreita similaridade genética e bioquímica quando comparado aos mamíferos, possibilita a detecção simultânea de mutação gênica, aberrações cromossômicas e/ou recombinação somática.

Esta metodologia baseia-se na indução de pêlos mutantes nas asas das moscas, que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA, que, por sua vez, levam à perda de heterozigidade dos genes *mwh* e *flr*³ (GRAF et al., 1984).

Cruzamentos

Nesta abordagem experimental foi empregado o cruzamento padrão - nas amostras de origem urbana - que origina larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450, e o cruzamento aprimorado - nas amostras de origem industrial - que apresenta larvas com alto nível constitutivo de citocromo P450 (HÄLLSTRÖM & BLANCK, 1985).

Tratamentos

Cada amostra de origem industrial e urbana foi diluída em água destilada e testada em duas concentrações (25% e 50%) assim como, na sua forma crua (100%). Como controle negativo foi utilizada a água destilada.

Larvas de terceiro estágio foram colocadas em tubos contendo 1,5g de meio sintético, onde foram acrescentados 5ml das soluções de tratamento. As larvas permaneceram nestas condições por aproximadamente 48 horas - tratamento crônico - até atingirem o estágio de pupa.

Análise microscópica

Para cada ponto de tratamento foram analisadas as asas de pelo menos 40 indivíduos - em microscópio óptico, com aumento de 400x - vi-

sando à identificação dos fenótipos dos pêlos existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas dos adultos.

Análise estatística

Para a avaliação genotóxica dos cinco pontos de coleta no rio Caí, as diferentes diluições foram comparadas com seus respectivos controles negativos. A análise estatística foi feita através do teste estatístico binominal condicional KASTENBAUM & BOWMAN (1970).

RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 são apresentados os dados obtidos através do SMART, quando foram consideradas as respostas obtidas nos adultos portadores do genótipo trans-heterozigoto, oriundos, respectivamente, do tratamento com amostras de origem urbana e industrial. Na tabela 1, os resultados obtidos a partir da coleta de março caracterizaram os km 52, 78 e 80 como genotóxicos, ambos capazes de induzir aumentos significativos no total de manchas. Já as amostras de junho mostraram-se todas destituídas de atividade genotóxica, enquanto as provenientes do km 52 coletadas em setembro apresentaram respostas positivas. Entretanto, como se pode observar na tabela 2 as duas amostras de origem industrial, nos três meses de coleta, não mostraram efeito genotóxico, uma vez que as frequências das diferentes categorias de manchas não foram significantemente superiores àquelas observadas nos respectivos controles negativos (água destilada).

DISCUSSÃO

No presente estudo, o SMART foi empregado para avaliar a genotoxicidade de amostras de água do rio Caí, que sofrem influência industrial e urbana, em três épocas distintas – março, junho e setembro – ao longo do ano de 1999. Os dados obtidos no presente estudo apontam para a ausência de genotoxicidade das amostras de água superficial, sob influência direta de dejetos oriundos do Pólo Petroquímico do Sul, e para a ação genotóxica de amostras de água associadas aos três diferentes pontos no mês de março – km 52, 78 e 80 que estão sob influência de esgotos domésticos. Este comportamento não foi observado para o mês de junho – já que não foram obtidos aumentos significativos, para todos os tipos de manchas, em relação ao controle negativo. No entanto, as coletas de setembro evidenciaram a toxicidade genética associada ao km 52 – localizado próximo à cidade de Montenegro.

Ainda mais, considerando os resultados observados, nas amostras de origem urbana, nos meses de março e junho, sugere-se uma correlação entre o nível pluviométrico e o diagnóstico positivo. De fato, no mês de março, foram registrados índices de pluviosidade de 12,3 mm, enquanto que no mês de junho (112,6 mm) estes valores foram aproximadamente dez vezes superiores. Entretanto, esta correlação não pode explicar os resultados positivos obtidos para o km 52, coletado em setembro – já que a pluviosidade (110,9 mm) foi tão elevada quanto à registrada em junho. Ainda que a diluição das águas do rio não tenha sido um fator determinante para a genotoxicidade deste ponto, esta resposta pode estar relacionada com a descarga diferencial de dejetos de pequenas indústrias que não apresentam qualquer estra-

tégia de tratamento e que juntamente com os esgotos cloacais e pluviais, são lançados diretamente no rio Caí. Ainda que, para os dejetos urbanos coletados em março de 1999, tenha sido sugerida uma correlação entre genotoxicidade positiva e índice pluviométrico este tipo de relação não foi identificada para as amostras industriais – assim como para os demais parâmetros físico-químicos analisados.

Finalmente, fica a sugestão de que, pelo menos em nossas condições experimentais, o impacto causado por despejos de origem urbana pode ser mais intenso do que o imposto por dejetos provenientes de indústrias de grande porte. De fato, apesar da extensa procura de informações bibliográficas, referentes à contribuição dos despejos urbanos para a genotoxicidade associada a águas superficiais do curso inferior do rio Caí, não foram encontrados registros - tanto centrados na toxicidade genética de despejos urbanos, quanto na comparação entre amostras de origem industrial e urbana. Consideramos, também relevante, o conjunto de dados publicados por WHITE, RASMUSSEN & BLAISE (1996) e WHITE & RASMUSSEN (1998), que apontam para os prejuízos causados por dejetos urbanos – que podem ser tão ou mais nocivos que os impostos pelos de origem industrial. Esta maior potência genotóxica pode ser atribuída ao seu maior volume de lançamento, assim como à sua natureza mais complexa - já que são formados pelo somatório de resíduos

domésticos e de indústrias de pequeno porte, que na grande maioria das vezes não utilizam qualquer tipo de tratamento.

Adicionalmente, a avaliação da toxicidade genética centrou-se no emprego do SMART em *Drosophila melanogaster*, procurando contribuir não apenas para o diagnóstico da qualidade das águas do curso inferior do rio Caí, mas também para a validação do seu emprego como uma ferramenta para o diagnóstico da genotoxicidade de amostras de origem ambiental.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam ausência de atividade genotóxica para as amostras de origem industrial, enquanto que as urbanas apresentaram toxicidade genética - em todos os pontos no mês de março, e somente no km 52 (referente à cidade de Montenegro) no mês de setembro. Estes resultados, evidenciam o potencial genotóxico das águas superficiais sob influência dos despejos domésticos, e de pequenas indústrias principalmente em função da ausência de qualquer estratégia de tratamento dos esgotos pluviais. O contrário ocorre com os efluentes provenientes das indústrias de grande porte, que dispõem de complexos sistemas de tratamento e disposição de rejeitos, em função do severo controle que recebem por parte dos órgãos ambientais.

Tabela 1 - Diagnóstico estatístico das freqüências de indução de clones mutantes após tratamento das larvas provenientes do cruzamento padrão com amostras de água do Cai sob influência de dejetos urbanos coletadas em março, junho e setembro de 1999.

Genótipos	Diluições e Pontos de Coleta	N. de indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas)/diag. estatístico ^a			
			MSP	MSG	MG	TM
			(1-2 cells) (m = 2)	(>2 cells) (m = 5)	(m = 5)	(m = 2)
Março						
KM 52						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	60	0.35 (21)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.40 (24)
	25	60	0.72 (43) +	0.10 (6) i	0.03 (2) i	0.85 (51) +
	50	70	0.70 (49) +	0.03 (2) i	0.00 (0) i	0.73 (51) +
	100	60	0.75 (45) +	0.005 (3) i	0.00 (0) i	0.80 (48) +
KM 78						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	60	0.35 (21)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.40 (24)
	25	40	0.68 (27) +	0.05 (2) i	0.05 (2) i	0.78 (31) +
	50	40	0.80 (32) +	0.20 (8) +	0.03 (1) i	1.03 (41) +
	100	40	0.75 (30) +	0.05 (2) i	0.10 (4) +	0.90 (36) +
KM 80						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	60	0.35 (21)	0.05 (3)	0.00 (0)	0.40 (24)
	25	40	0.73 (29) +	0.05 (2) i	0.10 (4) +	0.88 (35) +
	50	40	0.88 (35) +	0.20 (8) +	0.08 (3) i	1.15 (46) +
	100	40	0.80 (32) +	0.13 (5) i	0.03 (1) i	0.95 (38) +
Junho						
KM 52						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	50	0.54 (27)	0.12 (6)	0.00 (0)	0.66 (33)
	25	50	0.66 (33) -	0.10 (5) i	0.04 (2) i	0.80 (40) -
	50	50	0.50 (25) -	0.14 (7) i	0.04 (2) i	0.68 (34) -
	100	50	0.64 (32) -	0.08 (4) i	0.06 (3) i	0.78 (39) -
KM 78						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	50	0.54 (27)	0.12 (6)	0.00 (0)	0.66 (33)
	25	40	0.80 (32) i	0.10 (4) i	0.03 (1) i	0.93 (37) i
	50	50	0.42 (21) -	0.06 (3) -	0.00 (0) i	0.48 (24) -
	100	50	0.76 (38) i	0.08 (4) i	0.04 (2) i	0.88 (44) i
KM 80						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	60	0.47 (28)	0.12 (7)	0.00 (0)	0.58 (35)
	25	40	0.55 (22) -	0.08 (3) i	0.08 (3) i	0.70 (28) -
	50	40	0.55 (22) -	0.13 (5) i	0.03 (1) i	0.70 (28) -
	100	40	0.83 (33) -	0.10 (4) i	0.00 (0) i	0.93 (37) -
Setembro						
KM 52						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.48 (19)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.63 (25)
	25	40	0.90 (36) +	0.10 (4) i	0.08 (3) i	1.08 (43) +
	50	50	0.90 (45) +	0.10 (5) i	0.02 (1) i	1.02 (51) +
	100	40	0.90 (36) +	0.10 (4) i	0.03 (1) i	1.03 (41) +
KM 78						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.48 (19)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.63 (25)
	25	79	0.57 (45) i	0.10 (8) i	0.01 (1) i	0.68(54) -
	50	78	0.47 (37) -	0.10 (8) i	0.03 (2) i	0.60 (47) -
	100	75	0.57 (43) i	0.08 (6) i	0.03 (2) i	0.68 (51) -
KM 80						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.48 (19)	0.10 (4)	0.05 (2)	0.63 (25)
	25	60	0.53 (32) i	0.08 (5) i	0.00 (0) i	0.62(37) -
	50	70	0.66 (46) i	0.10 (7) i	0.01 (1) i	0.77 (54) -
	100	60	0.62 (37) i	0.08 (5) i	0.00 (0) i	0.70 (42) -

^a Diagnóstico Estatístico de acordo com Frei % Würgler (1988): +: positivo; -: negativo; i: inconclusivo; f+ fraco positivo; m: fator multiplicador, nível de significância: á = â = 0.05.

Tabela 2 - Diagnóstico estatístico das frequências de indução de clones mutantes após tratamento das larvas provenientes do cruzamento aprimorado com amostras de água do Caí sob influência de dejetos industriais coletadas em março, junho e setembro de 1999.

Genótipos	Diluições e Pontos de Coleta	N. de indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas)/diag. estatístico ^a			
			MSP (1-2 cells) (m = 2)	MSG (>2 cells) (m = 5)	MG (m = 5)	TM (m = 2)
Março						
KM 18,6						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.68 (27)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.75 (30)
	25	40	0.63 (25) -	0.10 (4) i	0.00 (0) -	0.73 (29) -
	50	40	0.75 (30) -	0.08 (3) -	0.05 (2) i	0.88 (35) -
	100	40	0.75 (30) -	0.08 (3) -	0.00 (0) -	0.83 (33) -
KM 13,6						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.68 (27)	0.08 (3)	0.00 (0)	0.75 (30)
	25	40	0.93 (37) i	0.13 (5) i	0.03 (1) i	1.08 (43) -
	50	40	0.85 (34) -	0.18 (7) i	0.00 (0) -	1.03 (41) -
	100	40	0.73 (29) -	0.13 (5) i	0.03 (1) i	0.88 (35) -
Junho						
KM 18,6						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.98 (39)	0.13 (5)	0.05 (2)	1.15 (46)
	25	40	1.00 (40) -	0.05 (2) -	0.03 (1) -	1.08 (43) -
	50	40	1.05 (42) -	0.23 (9) i	0.05 (2) -	1.33 (53) -
	100	40	1.05 (42) -	0.20 (8) i	0.00 (0) -	1.25 (50) -
KM 13,6						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.98 (39)	0.13 (5)	0.05 (2)	1.15 (46)
	25	40	1.00 (40) -	0.08 (3) -	0.00 (0) -	1.08 (43) -
	50	40	0.70 (28) -	0.10 (4) -	0.05 (2) -	0.85 (34) -
	100	40	1.08 (43) -	0.15 (6) -	0.08 (3) i	1.30 (52) -
Setembro						
KM 18,6						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.65 (26)	0.05 (2)	0.03 (1)	0.73 (29)
	25	40	0.53 (21) -	0.05 (2) -	0.03 (1) -	0.60 (24) -
	50	40	0.63 (25) -	0.00 (0) -	0.00 (0) -	0.63 (25) -
	100	40	0.53 (21) -	0.08 (3) i	0.00 (0) -	0.60 (24) -
KM 13,6						
<i>mwh / flr³</i>	Água Destilada	40	0.65 (26)	0.05 (2)	0.03 (1)	0.73 (29)
	25	40	0.63 (25) -	0.03 (1) -	0.00 (0) -	0.65 (26) -
	50	40	0.50 (20) -	0.05 (2) i	0.03 (1) -	0.58 (23) -
	100	40	0.55 (22) -	0.08 (3) i	0.00 (0) -	0.63 (25) -

^a Diagnóstico Estatístico de acordo com Frei % Würzler (1988): +: positivo; -: negativo; i: inconclusivo; f+ fraco positivo; m: fator multiplicador, nível de significância: á = â = 0.05.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FEPAM/GTZ. Levantamento dos principais usos do solo e da água na Bacia Hidrográfica do Rio Caí. v.1: Projeto de Cooperação Técnica Brasil/Alemanha, Porto Alegre, 1997.138p.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p.97-308, 1988.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 6, p.153-188, 1984.

HÄLLSTRON, 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.

KASTENBAUM, M. A. ; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v.9, p.527-549, 1970.

LEMOS,C.T. ; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutation Research**, v. 467, p.1-9, 2000.

VARGAS,V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (Salmonella/microsome). **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p.505-518, 1988.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.27, p.116-139, 1996.

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