

A UTILIZAÇÃO DO MEXILHÃO DOURADO (*Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)) COMO BIOMONITOR DE GENOTOXICIDADE AMBIENTAL

JULIANO SILVEIRA¹, IZABEL VIANA VILLELA², IURI MARQUES DE
OLIVEIRA³, JULIANA DA SILVA⁴,
JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES⁵

RESUMO

*Os testes de genotoxicidade são importantes na avaliação da ação do homem sobre os corpos d'água, complementando os critérios legalmente exigidos para verificar a qualidade de águas. Neste sentido, o potencial genotóxico de amostras de água superficial e sedimento da bacia do Lago Guaíba foi avaliado utilizando o bivalve *Limnoperna fortunei* como organismo bioindicador. Foram coletadas amostras no Parque Estadual de Itapuã, consideradas como ponto de referência, na foz do arroio Dilúvio e no lago Guaíba próximo à foz do Dilúvio. Para avaliar a resposta genotóxica, foram utilizados o ensaio cometa e a frequência de micronúcleos nas células da hemolinfa do molusco. As amostras de água e sedimento desses três locais de coleta induziram aumento de danos ao DNA nas células avaliadas, detectado por ambos os ensaios, quando comparadas com a amostra referência.*

Palavras-chave: genotoxicidade, biomonitoramento, contaminação ambiental, bacia do lago Guaíba, *Limnoperna fortunei*.

¹ Acadêmico do Curso de Biologia/PUC – Bolsista BIC/FAPERGS

² Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular/UFRGS

³ Acadêmico do Curso de Biologia/UFRGS – Bolsista BIC/CNPq

⁴ Professora – Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA (juliana.silva@ulbra.br)

⁵ Professor do Curso de Farmácia/ULBRA

ABSTRACT

*Nowadays the contamination of water resources as a consequence of anthropogenic discharges is becoming a major problem. Biomonitoring represents an important tool to identify environmental and human health damages. We evaluate the genotoxic contamination of the Guaíba Basin, using frequency of micronuclei and comet assays in cronically exposed Golden mussels (*Limnoperna fortunei*). Samples were collected in the Parque Estadual de Itapuã (reference point), in the mouth of the Dilúvio brook and in Guaíba lake near Dilúvio brook. All samples induced damage increase when compared to the reference point.*

Key words: *genotoxicity, biomonitoring, environmental contamination, Guaíba lake basin, Limnoperna fortunei.*

INTRODUÇÃO

A contaminação das fontes de água (rios, lagos e mares) é uma das mais críticas, pois deste elemento dependem todos os organismos vivos, inclusive o homem. Através da chuva, boa parte da poluição dos solos e do ar é carreada para água, se somando às descargas diretas proveniente de diferentes origens e tornando os corpos d'água o destino final de grande parte dos contaminantes gerados pelo homem.

Os poluentes que alteram a composição da água necessariamente afetarão a vida e/ou a fisiologia dos organismos que nela vivem. Dentre a gama de efeitos letais ou sub-letais induzidos pela assimilação desta mistura complexa, pode-se citar alterações no genoma celular por agentes genotóxicos, podendo gerar mutações e como consequência a formação de tumores. Estes agentes que lesam o DNA dificilmente são detectados em estudos epidemiológicos devido ao fato de seus efeitos levarem muito tempo para se manifestar e serem identificados. Por este motivo o seu monitoramento deve ser efetivo e contínuo (Arnaiz, 1997).

A detecção do potencial genotóxico em amostras de água pode ser realizada empregando uma

gama de bioensaios em diferentes tipos celulares, envolvendo experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Para a avaliação de genotoxicidade em células eucarióticas vem sendo amplamente aplicado o Ensaio de Eletroforese em Gel de Célula Única, Ensaio Cometa, que detecta danos primários no DNA: quebras de cadeia simples e/ou duplas, lesões alcalilábeis e pontes entre cadeias. Este teste pode ser realizado em qualquer célula eucariótica, não precisando ela estar necessariamente em divisão, bastando ter uma boa suspensão celular, em cultura (*in vitro*), ou extraídas de organismos expostos (*in vivo*) (para revisão, ver TICE et al., 2000).

Outro teste largamente recomendado para células eucarióticas é a Análise da Frequência de Micronúcleos, Teste de Micronúcleos (Mn), que avalia de forma indireta tanto quebras cromossômicas como disfunções na mitose (para revisão, ver FENECH, 1993; HAYASHI et al., 2000). Este ensaio é empregado principalmente em testes *in vivo*, nos quais podem ser utilizados vegetais ou animais expostos diretamente as amostras de água testadas, sedimentos, bem como outros agentes.

Organismos biomonitores são utilizados há muito tempo no que diz respeito a alertar pesso-

as sobre ambientes que apresentam risco. Considera-se a observação de animais intoxicados como indicador inicial da potencialidade do ambiente em causar danos à saúde humana. Para detecção de dano genotóxico, um organismo sentinela deve ser capaz de detectar diferentes tipos de danos em diferentes tipos celulares, além de ser sensível e de fácil acesso (LOEB e SPACIE, 1994). Em corpos d'água, é de grande valia o uso de moluscos bivalves, por serem animais filtradores, sem mobilidade e com capacidade de acumular os prováveis contaminantes (PAVLICA et al., 2001).

Avaliações ambientais utilizando diferentes ensaios genéticos vem sendo amplamente aplicadas na Bacia do Lago Guaíba (a mais importante do Estado do Rio Grande do Sul). Esta bacia hidrográfica é formada por nove sub-bacias (Guaíba, Gravataí, Sinos, Caí, Taquari-Antas, Alto Jacuí, Vacacaí, Pardo e Baixo Jacuí), em cuja área residem aproximadamente 5,9 milhões de habitantes em 251 municípios dos 497 existentes no Estado (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RS – Pró Guaíba, 1998). Nesta região estão localizadas 8.236 atividades industriais (Pró-Guaíba/ FEPAM, 1997), entre elas os principais setores produtivos do Estado que são: siderurgia, refinaria de petróleo, indústrias de cimento, papel, celulose, petroquímica, extração carbonífera, lavouras de exportação, setor coureiro-calçadista e metal-mecânico (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RS – Pró Guaíba, 1998). Esses setores são responsáveis por 86% do PIB do Rio Grande do Sul e 6,54% do PIB do Brasil. Em suas margens ainda estão presentes zonas de agricultura intensiva e regiões urbanas incluindo a região metropolitana da capital Porto Alegre. As águas da bacia do Lago Guaíba são utilizadas como fonte de abastecimen-

to para cerca de um milhão de habitantes (97% da população de Porto Alegre), e são uma importante via de navegação, pois, liga o centro do estado ao porto de Rio Grande. São ainda utilizadas para recreação, pesca, irrigação, habitat de espécies, fonte de lazer, turismo e harmonia paisagística (Secretaria da Coordenação e Planejamento do RGS – Pró Guaíba, 1998).

Quanto a atividade genotóxica no Lago Guaíba, amostras de água superficiais avaliadas com o ensaio *Salmonella*/Microsoma (ROLLA, 1995; ROLLA e HENRIQUES, 1996 e 1997) e com o teste de aberrações cromossômicas em medula de camundongos (GUIMMLER-LUZ et al., 1992), não induziram mutações gênicas nem cromossômicas. Entretanto, amostras de sedimentos analisadas pelo ensaio *Salmonella*/Microsoma (ROLLA, 1995; ROLLA e HENRIQUES, 1996 e 1997) apresentaram resposta mutagênica positiva com a linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica em pontos de coleta próximos a locais de liberação de esgoto urbano. Em uma avaliação da foz dos rios formadores do Guaíba e do próprio Lago Guaíba, utilizando o ensaio *Salmonella*/Microsoma, VILLELA (2001) também encontrou como principal local de liberação de compostos genotóxicos uma saída de esgoto urbano.

Visto a vasta gama de poluentes liberados na Bacia do lago Guaíba, e os diferentes resultados encontrados nos locais de amostragem, ainda se fazem necessários um maior numero de estudos buscando detectar os principais pontos de liberação e inferir os possíveis agentes que possam causar danos aos organismos e ao ecossistema. Permitindo assim que junto aos órgãos competentes se estabeleça um melhor plano de manejo e controle da poluição deste ambiente.

Visando a continuidade deste monitoramento na bacia do lago Guaíba, identificou-se o bivalve exótico *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado) como bom candidato a organismo sentinela devido a sua ótima adaptação, ampla distribuição, disponibilidade durante todo o ano e fácil acesso.

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo monitorar a foz de rios formadores do lago Guaíba e o próprio lago Guaíba utilizando os ensaios Cometa e Micronúcleos na hemolinfa do Bivalve exótico *Limnoperna fortunei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

As coletas foram realizadas em setembro de 2003, na foz do arroio dilúvio e no lago Guaíba antes e após a sua influência. Foram estabelecidos os seguintes pontos de coleta:

1 - Praia da Pedreira, Parque Estadual de Itapuã, município de Viamão (Local controle – contaminação ambiental mínima);

2 - Foz do Arroio Dilúvio, abaixo da ponte no cruzamento entre as Avenidas Borges de Medeiros e Ipiranga;

3 - Lago Guaíba, após saída do arroio Dilúvio (Guaíba BR);

4 - Lago Guaíba, na ponta inferior do Delta do Jacuí (Ponta da Cadeia).

Exposição

Após uma semana de adaptação as condições de laboratório, os moluscos foram expostos por 7 dias, em aquários de 2 litros, a amostras ambientais da bacia do lago Guaíba. A cada 24hs foi trocado 1/4 do volume de água e sedimento, com a intenção de manter a concentração dos contaminantes. A temperatura foi mantida entre 21 – 24°C durante o período de exposição. Após o período de exposição, a hemolinfa foi coletada do músculo adutor posterior do molusco, com agulha hipodérmica, sendo a mesma amostra utilizada em ambos ensaios de genotoxicidade.

Ensaio Cometa

O teste Cometa ou SCGE (Single Cell Gell electrophoresis test) é um teste de genotoxicidade que detecta danos primários causados no DNA. Na versão alcalina (pH 12.1), detecta quebras resultantes de ação direta ou indireta da substância testada sobre o DNA. O dano indireto é resultado de lesões como metilação e adutos, que, sendo alcalilábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino usado no ensaio. O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por TICE et al. (2000) e PAVLICA et al. (2001), com pequenas adaptações.

Após a coleta das células do organismo bioindicador, esta suspensão celular é colocada sobre uma lâmina com uma fina camada de agarose, estas são mergulhadas em uma solução de lise, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitirá a migração dos fragmentos de DNA. O teste consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células lisadas

embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas para microscopia. Após a coloração com nitrato de prata, os núcleos intactos são redondos. Já nas células lesadas, o DNA que migrou do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa. Os cometas são classificados de 1 – 4 de acordo com a quantidade de danos que apresentam, conforme descrito em Da Silva et al. (2000). Calcula-se o índice de dano através da soma dos danos das 100 células analisadas por “pool” de 4 indivíduos, sendo realizadas 4 réplicas por ensaio. Os resultados são avaliados estatisticamente (Anova Dunnett) determinando a indução ou não de quebras cromossômicas.

Teste de Micronúcleos

Micronúcleos são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pe-

queno núcleo individual, chamado micronúcleo. Os micronúcleos (Mn), então são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos). O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico. A Avaliação da Frequência de Mn foi realizada de acordo com o descrito por FENECH (1993), HAYASHI et al. (2000) e PAVLICA et al. (2000), com algumas adaptações. A frequência de Mn foi contada manualmente com auxílio do microscópio ótico, foram analisadas 1000 células por lâmina, sendo realizadas quatro réplicas de quatro animais.

RESULTADOS

O efeito genotóxico de amostras ambientais utilizando o ensaio cometa na hemolinfa de *Limnoperna fortunei* foi avaliado pelo parâmetro índice de dano e está apresentado na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1- Ensaio Cometa em hemolinfa de *Limnoperna fortunei* expostos por 7 dias a amostras ambientais da bacia do Lago Guaíba.

<i>Locais de coleta</i>	<i>n*</i>	<i>Índice de Dano</i>				<i>Média ± d.p.</i>
Itapuã	4	20	45	26	21	28,0 ± 11,6
Dilúvio	3	69	78	53		66,7 ± 12,7
Guaíba BR	4	53	47	56	46	50,5 ± 4,8
PontaCadeia	4	42	36	45	55	44,5 ± 7,9

n* : cada análise corresponde ao “pool” de quatro indivíduos. D.p.= Desvio padrão.

Os mexilhões tratados com amostras controle do Parque Estadual de Itapuã apresentaram um índice de dano inferior a 30, relativo ao dano basal dos indivíduos. Foram observados danos significativos ($P < 0,01$) ao DNA dos mexilhões expostos a água e sedimento do arroio Dilúvio, em relação ao controle (o dobro do índice). A amostra do Guaíba BR, também induziu aumen-

to nas lesões ao DNA dos mexilhões quando comparado ao controle, porém não com a mesma significância ($P < 0,05$). A contaminação presente no Guaíba Ponta da Cadeia foi suficiente para aumentar os efeitos sobre o material genético do molusco, no entanto, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($P = 2,35$) em relação à amostra de Itapuã.

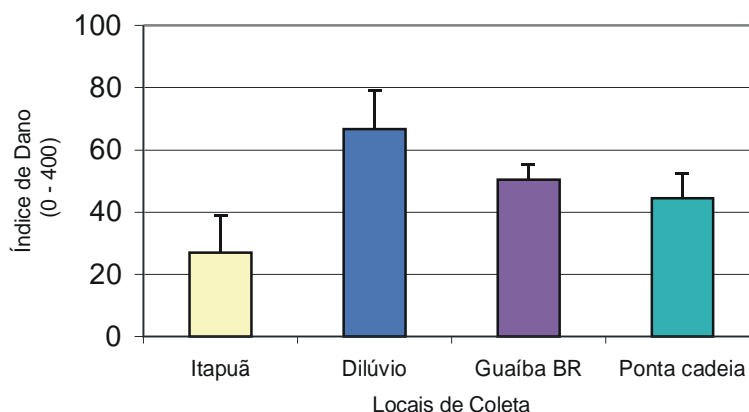


Figura 1 - Ensaio cometa alcalino (pH12.1) em hemócitos de *Limnoperna fortunei* expostos a amostras ambientais por 7 dias (ANOVA Dunett's * 0.05 **0.01)

Os resultados da avaliação de micronúcleos nos hemócitos dos indivíduos expostos as amos-

tras da bacia do lago Guaíba estão ilustrados na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2 - Teste de Micronúcleos em *hemolinfa* de *Limnoperna fortunei* expostos por 7 dias a amostras ambientais da bacia do Lago Guaíba.

Locais de coleta	n*	Micronúcleos em 1000 Células				Média ± d.p.
Itapuã	4	2	3	3	4	3,0 ± 0,8
Dilúvio	4	4	5	5	6	5,0 ± 0,8
Guaíba BR	4	4	5	4	6	4,8 ± 1,0
PontaCadeia	4	6	6	5	4	5,3 ± 1,0

n* : cada análise corresponde ao "pool" de quatro indivíduos. D.p.= Desvio padrão.

A amostra controle não induziu formação elevada de Mn, sendo observado somente a frequência basal inerente dos indivíduos (aproximadamente 3/1000). Os *Limnoperna* expostos às amostras do Dilúvio, Guaíba BR e Ponta da Cadeia

apresentaram um aumento similar de micronúcleos quando comparados com o observado em Itapuã. Os três resultados apresentaram significância estatística ($P < 0,05$), não sendo observada diferença entre os pontos de coleta.

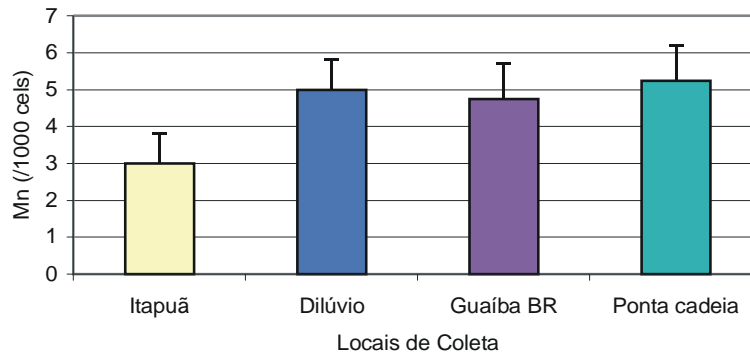


Figura 2 - Número de micronúcleos em hemócitos de *Limnoperna fortunei* expostos a amostras ambientais por 7 dias (ANOVA Dunett's * 0.05).

DISCUSSÃO

O arroio Dilúvio corta a cidade de Porto Alegre (capital do RS) e recebe desta uma grande contribuição de efluentes urbanos não tratados. Este arroio deságua diretamente no Lago Guaíba, carregando para este toda a contaminação orgânica que recebeu durante o seu percurso. O ensaio cometa demonstrou claramente o alto grau de contaminação genotóxica do arroio dilúvio, apresentando um aumento significativo no índice de dano, bem como sua influência sobre o lago Guaíba, pois somente no ponto após a sua influência (Guaíba BR) foi observado aumento significativo ($P < 0,05$ - índice de dano) (Fig. 1). A outra amostra coletada no lago Guaíba, apresentou um aumento na indução de dano que, embora alto não apresentou significância estatística. A resposta positiva

no Lago Guaíba foi menos evidente provavelmente devido à diluição sofrida pelos contaminantes ao serem liberados no grande volume de águas do Lago Guaíba. Estes resultados indicam a presença de contaminação antrópica e salientam uma diferença na composição das águas dos diferentes pontos de coleta no que se refere à presença de agentes que causam dano ao DNA.

De forma distinta, este comportamento não se repetiu com os resultados obtidos com o teste de micronúcleos. Neste ensaio, as três amostras apresentaram um aumento significativo de micronúcleos em relação a Itapuã, indicando uma contaminação por compostos genotóxicos similar entre os três pontos de coleta (Fig. 2). Esta uniformidade na resposta pode indicar uma semelhança entre o tipo de contaminantes pre-

sentes nas amostras, bem como às diferenças de sensibilidade entre os testes.

O ensaio cometa é conhecido por ser mais sensível na detecção da genotoxicidade que o teste de micronúcleos (MITCHELMOR e CHIPMAN, 1998). No entanto, alguns trabalhos já demonstram resultados positivos para micronúcleo acompanhados de resultados negativos em cometa (BOMBAIL et al., 2001; KLOBUCAR et al., 2003). Esta diferença pode ser atribuída a natureza distinta dos dois ensaios. Enquanto a frequência de micronúcleos detecta danos não reparáveis como lesões clastogênicas e aneugênicas, o ensaio cometa detecta lesões recentes e possíveis de serem reparáveis, como quebras e sítios alcali-lábeis (VILLELA et al., 2003). Assim, os resultados observados no ensaio cometa são originados de processos de dano no DNA, que podem ser reparados, enquanto que os micronúcleos observados persistem até o final da vida da célula. Outra hipótese para diferença seria o fato de a atividade aneugênica além de causar aumento de micronúcleos, causar pontes (crosslinks) DNA – DNA e DNA – proteína, o que dificulta a migração do DNA, resultando em resultados negativos no ensaio cometa (KLOBUCAR et al., 2003). Porém, esta hipótese pode não se aplicar aos nossos resultados, visto que o tratamento eletroforético é o recomendado pelo protocolo (guideline) para separação das fitas de DNA (TICE et al., 2000).

Desta forma, pode-se sugerir que o aumento não significativo no índice de dano no ponto Ponta da cadeia pode ser devido ao rápido reparo dos danos ao DNA ou a indução de células não viáveis de serem analisadas. A indução de índice de dano de maior significância pela amostra do arroio Dilúvio indica que a contaminação por

efluente urbano tem grande potencial de quebrar e/ou gerar sítios alcali-lábeis no DNA e que este potencial se dilui no grande volume de águas do lago Guaíba (Fig. 1). De maneira diferente, os compostos que causam aneugênese e/ou clastogênese apresentam uma distribuição mais uniforme entre os pontos de coleta, podendo indicar que não estão relacionadas diretamente às mesmas concentrações de contaminantes do Dilúvio (Fig. 2). Pode-se sugerir, por exemplo, que esta contaminação seja proveniente também da contaminação da água por embarcações, percolação do asfalto e condensação de contaminantes atmosférico, uma vez que estes são fontes de metais pesados e Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, conhecidos por serem indutores da formação de micronúcleos (VEINER e CANOVA, 1997; BOLOGNESI et al., 1999).

CONCLUSÕES

Aparentemente, as amostras apresentaram-se contaminadas principalmente por efluentes urbanos, onde induziram significativamente mais danos genotóxicos, em ambos os ensaios, em relação à amostra referência. Desta forma, pode-se inferir que o Mexilhão Dourado tem potencial para ser utilizado como bioindicador de contaminação ambiental na bacia do Lago Guaíba, bem como ambos os testes utilizados como biomarcadores. Ainda que ambos os ensaios tenham respondido positivamente a exposição ambiental, apresentaram sensibilidades diferentes. Estas diferenças, já discutidas amplamente na literatura, enfatizam a necessidade da aplicação de diferentes metodologias para a maior eficiência do monitoramento ambiental.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio da Companhia Petroquímica do Sul COPESUL e de sua equipe técnica nas campanhas de amostragem. Agradecemos também ao Laboratório de Genotoxicidade GENOTOX do Centro de Biotecnologia de UFRGS, a CAPES, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNAIZ, R. R. **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos**. La Ciencia para Todos. 2.ed. México: Fondo de Cultura Económica, 1997. 95 p.

BOLOGNESI, C. et al. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.33, p.287- 292, 1999.

BOMBAIL, V. et al. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p. 383-392, 2001.

FENECH, M. The cytokinesis – block micronucleous technique: a detailed description of the method and applications to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, Amsterdam, v.285, p.35-44, 1993.

GUIMMLER-LUZ, M. C.; ERDTMANN, B.; BALBUENO, R. A. Analysis of clastogenic effect of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v.279, p.227-231, 1992.

HAYASHI, M. et al. *In vitro* rodent erythrocyte micronucleus assay: II Some aspects of protocol design including repeated treatments integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.234-252, 2000.

KLOBUCAR, G. I. V. et al. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, v.64, p.15-23, 2003.

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

LEMOS, C.T. de. et al. Genotoxicity of river water under the influence of petrochemical industrial complexes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.52, p.848-855, 1994.

LOEB, S. L.; SPACIE, A. **Biological Monitoring for Aquatic Systems**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 381p.

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

PAVLICA, M. et al. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. **Mutation Research**, v.465, p.145-150, 2000.

PAVLICA, M. et al. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay.

Mutation Research, v.490, p.209-214, 2001.

RIO GRANDE DO SUL (Estado). Secretaria Executiva do Pró-Guaíba; RIO GRANDE DO SUL (Estado). Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. **Diagnóstico da poluição gerada pelas áreas industriais localizadas na área da bacia hidrográfica do Guaíba**. Porto Alegre, 1997. 151p.

ROLLA, H. C. **Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimentos do rio Guaíba e lodo proveniente da indústria de papel e celulose**. 1995. 114f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

ROLLA, H. C.; HENRIQUES, J. A. P. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de lodo proveniente da indústria de papel e celulose. **O Papel**, n.12, p.95-99, 1997.

ROLLA, H. C.; HENRIQUES, J. A. P. Avaliação da atividade mutagênica de amostras de sedimento do Rio Guaíba e Lodo proveniente da indústria de papel e celulose. **O Papel**, n.11, p.85-93, 1996.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Executiva do Pró-Guaíba. **Baía de todas as águas: preservação e gerenciamento ambiental na bacia hidrográfica do Guaíba**. Porto Alegre, 1998. 112p.

SILVA, J. da et al. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.241-245, 2000.

SILVA, R. M. da. **Genotoxicidade associada a amostras de água do rio Caí sob influência de dejetos urbanos**. 2000. 100f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

VARGAS, V. M. F. **Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais**. 1992. 237f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

VARGAS, V. M. F. et al. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration / extraction procedures. **Mutation Research**, Amsterdam, v.343, p.31- 52, 1995.

VARGAS, V. M. F. et al. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.490, p.141-158, 2001.

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**, Ribeirão Preto, v.11, n.3, p.505-518, 1988.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, Amsterdam, v.319, p.31-45, 1993.

VERNIER, P.; MARON, S.; CANOVA, S.

Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. **Mutation Research**, Amsterdam, v.390, p.33-44, 1997.

VILLELA, I. V. **Avaliação genotóxica pelo teste *Salmonella*/microssoma e determinação de contaminantes químicos de amostras de água superficial da bacia do Guaíba**. 2001. 125f. Disserta-

ção (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

VILLELA, I. V. et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.145-163.