

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES
AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA
URBANA**

Autor: Nathan Pereira Lima Amorim

Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

Coorientadores: Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes e
Dr. Fernando Rogério de Carvalho

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2020

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES
AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA
URBANA**

Autor: Nathan Pereira Lima Amorim

Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

Coorientadores: Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes e
Dr. Fernando Rogério de Carvalho

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – campus Rio Verde - Área de Concentração: Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

AA524a Amorim, Nathan Pereira Lima
AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES
AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA URBANA /
Nathan Pereira Lima Amorim; orientadora Lia Raquel
Souza Santos; co-orientadora Alessandro Ribeiro
Morais. -- Rio Verde, 2020.
42 p.

Dissertação (em Mestrado em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2020.

1. Ecotoxicologia. 2. Micronúcleos. 3.
Histologia. 4. Conservação. 5. Cerrado. I. Souza
Santos, Lia Raquel , orient. II. Morais, Alessandro
Ribeiro, co-orient. III. Título.



Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano
Sistema Integrado de Bibliotecas

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- Tese
 Dissertação
 Monografia – Especialização
 TCC - Graduação
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____
- Artigo Científico
 Capítulo de Livro
 Livro
 Trabalho Apresentado em Evento

Nome Completo do Autor: Nathan Pereira Lima Amorim
Matrícula: 2018102310840062
Título do Trabalho: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA URBANA

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01/05/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 15/04/2020
Local Data

Nathan Pereira Lima Amorim

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Fia Borges

Ciente e de acordo:

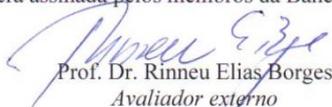
Assinatura do(a) orientador(a)

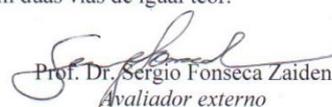


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
 INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
 CAMPUS RIO VERDE - GO
 DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

**ATA Nº 39 (TRINTA E NOVE)
 BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos vinte dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às 14:00 (quatorze horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges (orientadora), Prof. Dr. Rinneu Elias Borges (avaliador externo) e Prof. Dr. Sergio Fonseca Zaiden (avaliador externo), sob a presidência do primeiro, em sessão pública realizada no Auditório do prédio da DPGPI, no IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, da autoria de **Nathan Pereira Lima Amorim**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, e procedida às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**, na área de concentração Conservação dos Recursos Naturais, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGBio da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade, se não cumprida essa condição, em até 60 (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, eu, Renata Maria de Miranda Rios Resende, secretária do PPGBio, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em duas vias de igual teor.


 Prof. Dr. Rinneu Elias Borges
 Avaliador externo
 UniRV / Rio Verde


 Prof. Dr. Sergio Fonseca Zaiden
 Avaliador externo
 UniRV / Rio Verde


 Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges
 Presidente da Banca
 IF Goiano / Rio Verde

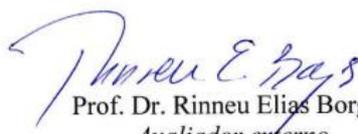
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES
AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE AMBIENTE
URBANO

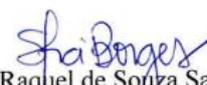
Autor: Nathan Pereira Lima Amorim
Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos Borges

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2020.


Prof. Dr. Rinneu Elias Borges
Avaliador externo
UniRV / Rio Verde


Prof. Dr. Sergio Fonseca Zaiden
Avaliador externo
UniRV / Rio Verde


Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

Dedicatória

A todos que torceram por mim e,
principalmente, me deram
suporte para contribuir com
ciência, os seus esforços

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Giovani Martins Amorim e Marília Pereira Lima Amorim, que guerreiros como são nunca me deixaram faltar educação, que me ensinaram o valor de perseverar nas dificuldades e não ter medo do novo, sempre enfrentando e vencendo.

Giovana Pereira Lima Amorim e Ariadne Pereira Lima Amorim, minhas irmãs e ao meu brother Pedro Henrique Amorim Tonhela, que me inspiram ser uma pessoa melhor no dia-a-dia, e me dão coragem para buscar meu lugar ao Sol.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Raquel de Souza Santos, uma líder nata, que teve paciência e empenho em me ensinar, e assim tornar esta conquista real. Obrigado pelo conhecimento, pela dedicação, pela confiança e inspiração.

Ao professor Dr. Rinneu Elias Borges, um amigo que Rio Verde me deu. Um espelho de pesquisador, que sempre esteve presente e disposto a ajudar, seja nas coletas, nas ideias de trabalho, uma amizade que eu levo com carinho.

A Dra. Mónica Sonia Rodriguez, que se não fosse os ensinamentos da graduação nunca chegaria tão longe, te dedico esta conquista e meu carinho pela excelente pesquisadora e pessoa que você é.

Ao meu amigo Dr. Wagner Martins Santana Sampaio, inspiração nos meus caminhos ictiológicos. Obrigado pela confiança e pelos ensinamentos de vida, obrigado por mostrar novos rumos e permitir nadar para águas desconhecidas.

Ao professor Dr. Fernando Carvalho que se fez solícito a qualquer momento que precisei.

Ao prof. Dr. Sérgio Zaiden, da Universidade de Rio Verde, por compartilhar seu conhecimento na obtenção do sangue dos animais a partir da punção da veia caudal, e sugestões dadas no início do experimento.

Aos professores e pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa – *campus* Rio Paranaíba, que durante minha graduação despertaram em mim a vontade de ser Biólogo e pesquisador.

Aos meus professores do Instituto Federal Goiano – *campus* Rio Verde: Dr. Alessandro de Moraes, Dr. Fábio Dyszy, Dra. Maria Andreia, Dr. Jânio Moreira, Dr. Fábio Carvalho e Dr. Fernando Farache, por terem contribuído durante o caminho com ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos Patrícia Moreira, Nathany Moraes, Lara Oliveira, André Oliveira, Anderson Rabelo e Davi, obrigado pela companhia e inspiração.

Aos meus amigos do IPEFAN (Instituto de Pesquisa em Fauna Neotropical), Frederico Beleí, Patrícia Giongo, Daniel e Rodrigo, obrigado por terem aberto portas com o conhecimento ictiológico.

Aos meus amigos Bruno Barros Bittar, Marco Antônio Guimarães, Nayara Santos e Antonio Olímpio. Pessoas distintas que me inspiraram, meu obrigado por serem especiais nesta trajetória.

A família LABAN como um todo: Seixas, Tainã, Itamar, Hércules, Gustavo, Cirley, Leissa, Marcela, Luana, Elaine, Roniel, Beatriz, Alisson, Carol e Wadson.

Aos pesquisadores, e amigos Rhayane Alves de Assis e Marcelino Benvindo de Souza que desde o primeiro dia se fizeram presentes durante minha pesquisa. Obrigado pelos ensinamentos, pela ajuda na escrita, pela amizade e pelas risadas.

Aos meus amigos de Rio Verde que fizeram da minha vida um caleidoscópio de aventuras, obrigado Carly, Marcela, Rychard, Ana Júlia, Théo, Lucas, Kemylla, Tawany.

Obrigado a Alevinos Rio verde pela ração sedida durante o experimento.

Ao Instituto Federal Goiano – *campus* Rio Verde por ter me dado a oportunidade de cursar o mestrado, assim como ter fornecido os recursos necessários para a realização deste estudo. Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação e a todos os docentes que contribuíram para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que me permitiu concluir o mestrado.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nathan Pereira Lima Amorim, é natural de Santo Antônio do Gramma, Minas Gerais. Nasceu em 1991, é filho de Giovani Martins Amorim e Marília Pereira Lima Amorim. Concluiu o ensino médio no ano de 2008, no Instituto Montessori, na cidade de Ponte Nova-MG. Iniciou sua formação acadêmica no ano de 2010, no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas – com ênfase na Conservação da Biodiversidade na Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Rio Paranaíba, Minas Gerais. Durante a graduação foi estagiário voluntário no Laboratório Didático de Vertebrados, atuando com taxonomia de peixes. Ao término da graduação atuou como Biólogo/Analista Ambiental pelo Instituto de Pesquisa em Fauna Neotropical (IPEFAN), onde trabalhou com ictiofauna em consultorias ambientais, agregando experiência em zoologia, com ênfase em ictiologia. No ano de 2018 ingressou no mestrado em Biodiversidade e Conservação no IFGoiano - *campus* Rio Verde, atuando na linha de pesquisa Ecotoxicologia, o qual concluiu no ano de 2020.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES	XIV
RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
2. OBJETIVOS	9
3. CAPÍTULO I	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
3.1 INTRODUÇÃO	13
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.3 RESULTADOS.....	17
3.4 DISCUSSÃO.....	21
3.5 CONCLUSÃO	25
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
4. CONCLUSÃO GERAL.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA URBANA

	Página
Tabela 1. Valores médios das variáveis físicas e químicas da água coletada no córrego do Sapo (<i>in situ</i>) no município de Rio Verde e dos animais acondicionados em laboratórios (<i>ex situ</i>) durante o experimento.....	17
Tabela 2. Valores das variáveis químicas da água coletada no córrego do Sapo, no município de Rio Verde.....	17
Tabela 3. Análise microbiológica da água coletada no córrego do Sapo, no município de Rio Verde.....	18
Tabela . Média de MN e AENs (2000 células/animal) em eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> coletados no córrego do Sapo, município de Rio Verde.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA URBANA

	Página
Figura 1. Fotomicrografia de: A) Célula saudável e B) Micronúcleo encontrados no sangue periférico de peixes (objetiva de 100x)..	20
Figura 2. Alterações eritrocitárias nucleares (AENs) presentes em sangue periférico de peixes (objetiva de 100x). A) Célula com Bolha Nuclear; B) Célula com Núcleo Lobado; C) Célula com Núcleo Reniforme; D) Célula com Núcleo Entalhado; E) Célula com Núcleo Segmentado; F) Célula Binucleada.	20
Figura 3. Frequência média da soma das alterações eritrocitárias nucleares nos peixes <i>Oreochromis niloticus</i> coletados no córrego do Sapo em Rio Verde-GO e dos peixes que permaneceram em laboratório em água limpa para avaliação da recuperação.	21

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
IFGoiano: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano
MN: Micronúcleo
AEN: Alteração Eritrocitária Nuclear
pH: Potencial Hidrogeniônico
TDS: Sólidos Totais Dissolvidos
OD: Oxigênio Dissolvido
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
LQ: Limite de Quantificação
VMP: Valor Máximo Permitido
NR: Não Há Recomendação
HE: Hematoxilina-Eosina
°C: Graus Celsius
μ/s: Microsiemens
ppm: Partes por Milhão
psu: *Practical Salinity Unit*
KΩ: Kiloohm

RESUMO GERAL

AMORIM, NATHAN PEREIRA LIMA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio verde – Fevereiro de 2020. **Avaliação ecotoxicológica de contaminantes ambientais em populações de peixes de Unidade de Conservação e ambiente antropizado.** Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos. Coorientadores: Alessandro Ribeiro de Moraes e Fernando Rogério de Carvalho.

As atividades urbanas geram poluição aos ecossistemas aquáticos por meio do escoamento de compostos tóxicos de difícil quantificação, e podem ocasionar danos aos organismos aquáticos. O uso de técnicas citológicas, como a análise da integridade de células sanguíneas a partir do teste do Micronúcleo, pode auxiliar na detecção de alterações eritrocitárias nucleares e mutações nos animais a nível genético, como reflexo da exposição a compostos tóxicos. Neste estudo, esta técnica foi empregada para comparar os efeitos dos efluentes urbanos em uma população de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo), os quais foram coletados e armazenados em condições laboratoriais. A comparação ocorreu entre os mesmos indivíduos do dia da coleta, e após 30 dias e 45 dias de recuperação. Não foram encontradas diferenças ($p>0,05$) na frequência de células com micronúcleo, entretanto houve diferenças significativas ($p<0,05$) quanto a outras alterações eritrocitárias nucleares, tais como: célula com bolha nuclear, célula com núcleo reniforme, núcleo lobado, célula binucleada, núcleo entalhado, núcleo segmentado, para animais em exposição quando comparados aos animais de 30 e 45 dias de recuperação. O teste do MN é o mais usado para avaliar efeitos mutagênicos em peixes, se comportando como uma ferramenta

eficaz para o diagnóstico ambiental, que como demonstrado nos nossos resultados pedem uma atenção à saúde dos peixes, considerando sua importância econômica e funcional.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia; Micronúcleos; Histologia; Conservação; Cerrado.

GENERAL ABSTRACT

AMORIM, NATHAN PEREIRA LIMA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio verde – Fevereiro de 2020. **Ecotoxicological evaluation of environmental contaminants in fish populations of a Conservation Unit and anthropized environment.** Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos. Coorientadores: Alessandro Ribeiro de Moraes e Fernando Rogério de Carvalho.

Urban activities generate pollution to aquatic ecosystems through the flow of toxic compounds that are difficult to quantify, and can cause damage to aquatic organisms. The use of cytological techniques, such as the analysis of blood cell integrity from the Micronucleus test, can assist in the detection of nuclear erythrocyte alterations and mutations in animals at the genetic level, as a reflection of exposure to toxic compounds. In this study, this technique was used to compare the effects of urban effluents on a population of fish of the species *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia), which were collected and stored under laboratory conditions. The comparison occurred between the same individuals on the day of collection, and after 30 days and 45 days of recovery. No differences were found ($p > 0.05$) in the frequency of cells with micronucleus, however there were significant differences ($p < 0.05$) in relation to other nuclear erythrocyte changes, such as: cell with nuclear bubble, cell with reniform nucleus, nucleus lobed, binucleated cell, notched nucleus, segmented nucleus, for animals on display when compared to animals at 30 and 45 days of recovery. The MN test is the most used to assess mutagenic effects in fish, behaving as an effective tool for environmental diagnosis, which, as demonstrated in our results, calls for attention to fish health, considering its economic and functional importance.

KEY WORDS: Ecotoxicology; Micronuclei; Histology; Conservation; Cerrado.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As diferentes atividades antrópicas exercidas pelo homem às margens de um curso de água geram resíduos e poluição que alteram a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos (Rebouças, 1997). Essas atividades em áreas urbanas estão relacionadas as descargas de efluentes industriais e domésticos, os quais quando despejados nos corpos d'água criam uma mistura entre os agentes biológicos e químicos, que ao interagirem com os organismos presentes podem causar efeitos de difícil avaliação por meio de simples análises químicas da água (Vasanthi et al., 2013). As reações e substâncias formadas a partir destas misturas podem provocar efeitos na biota aquática, nas assembleias de peixes e pode levar risco a saúde humana (Akaishi, 2007; Hering et al., 2015; Lorente et al., 2015).

A bacia do rio Paraná encontra-se disposta em áreas populosas do Brasil e sofre severamente com atividades antrópicas, principalmente agrícolas e urbanas (Agostinho et al., 1997). Uma das maneiras de minimizar a contaminação destas áreas é a criação de Áreas de Proteção Ambiental (APA) que são utilizadas para o manejo da água a partir de diretrizes que concedam proteção e restauração das bacias hidrográficas. No entanto, dependendo da região alguns rios ficam de fora das APA's levando risco à saúde humana (Barros et al., 2017, Dalzochio et al., 2018).

Os peixes, devido sua estreita dependência da água em todo seu ciclo de vida, são considerados organismos modelo para avaliação da qualidade do ambiente aquático devido a sua interação com os diferentes níveis tróficos e a sensibilidade a concentrações de substâncias tóxicas (Rocha et al., 2009; Jesus et al., 2016). Assim, o

monitoramento destes ambientes utilizando organismos modelos e técnicas que utilizam biomarcadores constituem uma ferramenta eficaz a fim de avaliar o efeito destes poluentes tanto no ambiente quanto no animal (Bueno-Krawczyk et al., 2015).

O teste do Micronúcleo é um dos biomarcadores mais usados para avaliar os efeitos mutagênicos em peixes se comportando como uma ferramenta eficaz para o diagnóstico ambiental (Hoshina et al., 2008; Jesus et al. 2016). Micronúcleos são pequenos corpos nucleares que surgem a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos que se atrasam durante o processo de divisão celular da anáfase, de tal forma que não se incorporam ao núcleo das células filhas. Essas anormalidades celulares podem ser irreversíveis e se manifestarem nas gerações futuras, levando à perda da diversidade de espécies em ambientes impactados (Obiakor, 2012). Outras anormalidades eritrocitárias nucleares como picnose, cariólise, cariorréxi, brotos e cromatina condensada, também são avaliadas e quando presentes demonstram em conjunto a formação de instabilidade genética (Carrasco, 1990). Assim, ferramentas morfológicas contribuem para entendimento de como as substâncias genotóxicas afetam, em nível celular estes organismos (Gayfullina et al., 2006; Uçkan & Sak, 2010).

Pesquisas a fim de elucidar o impacto destes contaminantes nas assembleias de peixes a partir da técnica do MN têm se intensificado nos últimos anos. Barros et al., (2017) ao avaliar a importância de áreas de proteção ambiental (APA) para a manutenção da qualidade ambiental em cinco rios da bacia do rio Paraná, abre um alerta para áreas onde espécies apresentem alta frequência de MN e danos no DNA. Os estudos de Viana et al. (2018) e Dalzochio et al. (2018), utiliza da técnica para avaliar a qualidade da água dos rios e riscos à saúde pública.

No entanto, mesmo existindo trabalhos que abordem a importância de estudos ecotoxicológicos, ainda existe uma lacuna sobre seus efeitos nas assembleias de peixes. Dessa forma, esse estudo propôs avaliar os efeitos dos contaminantes ambientais sobre uma população de peixes de ambiente urbano, de modo a diminuir essas lacunas de conhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, A.A., Júlio, H.F. Jr, Gomes, L.C. 1997. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: Vazzoler A.E.A.M., Agostinho, A.A.,

- Hahn, N.S. (eds) A planície de inundação do alto rio Paraná. Maringá. EDUEM, Nupélia, pp 190–208.
- Akaishi, F.M. 2007. Evaluation of toxicity of wastewater treated and untreated into the marine bivalve *Mytilus edulis*. 133p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Barros, I.T., Ceccon, J.P., Glinski, A., Liebel, S., Grötzner, S.R., Randi, M.A.F., Benedito, E., Ortolani-Machado, C.F., Filipak Neto, F., De Oliveira Ribeiro, C.A. 2017. Environmental risk assessment in five rivers of Parana River basin, Southern Brazil, through biomarkers in *Astyanax* spp. Environmental Science and Pollution Research, 24(19), p. 16228–16240.
- Bueno-Krawczyk, A.C.D., Guiloski, I.C., Piancini, L.D.S., Azevedo, J.C., Ramsdorf, W.A., Ide, A.H., Guimarães, A.T.B., Cestari, M.M., Silva De Assis, H.C., 2015. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. Chemosphere v.135, p. 257–264.
- Carrasco, K.; Tilbury, M. 1990. Myers Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47, pp. 2123-2136.
- Dalzocho, T., Rodrigues, G.Z.P., Simões, L.A.R. 2018. *In situ* monitoring of the Sinos River, southern Brazil: water quality parameters, biomarkers, and metal bioaccumulation in fish. Environ Sci Pollut Res 25, 9485–9500.
- Gayfullina, L.R.; Saltykova, E.S.; Nikolenko, A.G. 2006. Cellular immune reactions participating in resistance formation of Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) larvae and imago to a biopreparation for potato. Resistant Pest Management Newsletter, v. 15, p. 22-24.
- Hering, D., Carvalho, L., Argillier, C., Beklioglu, M., Borja, A., Cardoso, A.C., Duel, H., Ferreira, T., Globevnik, L., Hanganu, J., Hellsten, S., Jeppesen, E., Kodes, V., Solheim, A.L., Noges, T., Ormerod, S., Panagopoulos, Y., Schmutz, S., Venohr, M., Birk, S., 2015. Managing aquatic ecosystems and water resources under multiple stress: an introduction to the MARS project. Sci. Total Environ. 503-504,10-21.
- Hoshina, M.M., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. Mutat Res 656(1–2), p. 44–48.
- Jesus, I.S., Cestari, M.M., Bezerra, M.A., Mello Affonso, P.R. 2016. Genotoxicity effects in freshwater fish from a Brazilian impacted river. Bull Environ Contam Toxicol 96(4), p.490–495.
- Lorente, C., Causapé, J., Glud, R.N., Hancke, K., Merchán, D., Muñoz, S., Val, J., Navarro, E. 2015. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. Sci. Total Environ. 503-504, 151-158.
- Obiakor, M. O.; Okonkwo, J. C.; Nnabude, P. C. Ezeonyejiaku, C. D. 2012. Ecogenotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as *In situ* Aquatic Pollution Biomarker: a Review. Journal of Animal Science Advances, v. 2(1): p. 123-133.
- Rebouças, A.C., Braga, B., Tundisi, J.G. 1997. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo, Acad. Bras. Cien./IEA-USP, p. 717.
- Rocha, C.A.M., Lima, P.D.L., Santos, R.A., Burbano, R.M.R. 2009. Evaluation of genotoxic effects of xenobiotics in fishes using comet assay—a review. Rev Fish Sci 17(2), p. 170–173.
- Uçkan, F., Sak, O. 2010. Cytotoxic effect of Cypermethrin on *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) larval hemocytes. Ekoloji, v. 19, p. 20–26.

- Vasanthi, L.A., Revathi, P., Mini, J., Munuswamy, N. 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. *Chemosphere* v. 91, p. 1156–1164.
- Viana, L.F., Suárez, Y.R., Cardoso, C.A.L. 2018. The Response of Neotropical Fish Species (Brazil) on the Water Pollution: Metal Bioaccumulation and Genotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol* 75, 476–485.

2. OBJETIVOS

Geral:

Analisar os efeitos genotóxicos dos contaminantes urbanos a partir da formação de micronúcleos (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AEN) no tecido sanguíneo de peixes adultos, coletados em área urbana (com incidência de atividades industriais e domésticas) no município de Rio Verde, GO. Também objetivou-se avaliar a capacidade de recuperação dos animais mantidos por um período de 30 e 45 dias livres da exposição à efluentes urbanos.

Especificos:

- Identificação dos espécimes de peixes coletados;
- Analisar a formação de micronúcleos (MN) no tecido sanguíneo dos peixes;
- Identificar outras possíveis anormalidades eritrocitárias nucleares (AEN) nos animais;
- Verificar o potencial de recuperação dos animais quando livres da exposição à contaminantes ambientais.

3. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA URBANA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS EM POPULAÇÕES DE PEIXES DE ÁREA URBANA

RESUMO

As atividades urbanas geram poluição aos ecossistemas aquáticos colocando em risco a integridade dos organismos. O uso de técnicas citológicas, como a análise da integridade de células sanguíneas a partir do teste do Micronúcleo, pode auxiliar na detecção de alterações eritrocitárias nucleares e mutações nos animais a nível genético, como reflexo da exposição a compostos tóxicos. Neste estudo, esta técnica foi empregada para avaliar os efeitos dos efluentes urbanos em uma população de peixes, os quais também foram coletados e avaliados em condições laboratoriais. A comparação ocorreu entre os mesmos indivíduos *in situ*, e após 30 e 45 dias desses animais em recuperação. Constatamos que não houve diferença quanto a frequência de micronúcleo nos animais do dia da captura em relação aos animais que permaneceram por um período de recuperação ($p > 0,05$). Por outro lado, outras anormalidades nucleares eritrocitárias, como, bolha nuclear, reniforme, núcleo lobado, binucleada, entalhada, segmentada estiveram em maior frequência nos animais do dia da coleta quando comparados aos recuperados. Esses resultados evidenciam que os animais correm risco quando expostos aos xenobióticos urbanos, entretanto, são capazes de se recuperar com a restauração da qualidade ambiental e com o tempo.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, Ecotoxicologia, Anormalidades eritrocitárias nucleares, Micronúcleo, Genotoxicidade.

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS IN FISH POPULATIONS IN URBAN AREA

ABSTRACT

Urban activities generate pollution to aquatic ecosystems putting the integrity of organisms at risk. The use of cytological techniques, such as the analysis of blood cell integrity from the Micronucleus test, can assist in the detection of nuclear erythrocyte changes and mutations in animals at the genetic level, as a reflection of exposure to toxic compounds. In this study, this technique was used to evaluate the effects of urban effluents on a population of fish, which were also collected and evaluated under laboratory conditions. The comparison took place between the same individuals *in situ*, and after 30 and 45 days of these animals in recovery. We found that there was no difference regarding the frequency of micronucleus in the animals on the day of capture in relation to the animals that remained for a recovery period ($p > 0.05$). On the other hand, other erythrocyte nuclear abnormalities, such as nuclear bubble, reniform, lobed nucleus, binucleated, notched, segmented were more frequent in the animals on the day of collection when compared to those recovered. These results show that animals are at risk when exposed to urban xenobiotics, however, they are able to recover with the restoration of environmental quality and over time.

Key words: *Oreochromis niloticus*, Ecotoxicology, Nuclear erythrocyte abnormalities, Micronucleus, Genotoxicity

3.1 INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas em áreas urbanas potencializam as descargas de efluentes industriais e domésticos nos cursos hídricos. Estes efluentes quando despejados nos corpos d'água criam uma mistura complexa entre os agentes biológicos e químicos. As reações e substâncias formadas a partir destas misturas podem provocar efeitos na biota aquática e nas assembleias de peixes, além de elevarem os riscos à saúde humana (Akaishi, 2007; Hering et al., 2015; Lorente et al., 2015).

Essa contaminação dos corpos d'água é uma preocupação ambiental crescente por serem depósitos finais de vários outros xenobióticos de origem agrícola, doméstico e industrial, além dos impactos referentes ao represamento, assoreamento, mineração e introdução de espécies exóticas (Drummond et al., 2005; Langeani et al., 2009; Vieira et al., 2016). Assim, esses contaminantes interagem com os organismos e podem causar efeitos de difícil avaliação por meio de uma simples análise química da água (Vasanthi et al., 2013). Dessa forma, o uso de organismos bioindicadores como os peixes podem gerar maior espectro da saúde dos ecossistemas aquáticos.

Os peixes, devido à estreita dependência da água em todo seu ciclo de vida, são considerados organismos modelo para avaliação da qualidade do ambiente aquático. Possuem íntima interação com os diferentes níveis tróficos e sensibilidade às baixas concentrações de substâncias tóxicas (Rocha et al., 2009; Jesus et al., 2016). Nesse sentido, os peixes tornam-se fortes candidatos à sentinelas da qualidade dos recursos hídricos.

Nesse contexto, o ensaio de micronúcleo, conduzido no sangue periférico de peixes têm sido utilizado principalmente como variáveis na avaliação da genotoxicidade (Baršienė et al., 2006) a mais de 30 anos. Essa técnica é considerada uma das menos invasivas e muito utilizada no monitoramento da fauna selvagem (Benvindo-Souza et

al., 2019; Borges et al., 2019a, 2019b). Baseia-se na análise da integridade de células sanguíneas e podem auxiliar na detecção de mutações e alterações eritrocitárias (Bolognesi & Hayashi, 2011; Arslan et al., 2015). Os micronúcleos são produzidos a partir de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que ficam na divisão celular devido à falta de centrômero, dano no centrômero ou defeito na citocinese (Baršienė et al., 2006). Portanto, as anormalidades celulares podem se manifestar nas gerações futuras, levando implicações na integridade genética e ecológica das espécies afetadas (Obiakor, 2012).

Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos genotóxicos em peixes coletados em córrego urbano em um dos municípios mais populoso do estado de Goiás, com o intuito de rastrear os possíveis efeitos da poluição urbana sobre esses organismos. O estudo avaliou, portanto, se existe diferença na frequência de micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocitárias em peixes capturados em córrego poluído e a reanálise desses animais após 30 e 45 dias de recuperação em água limpa.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta dos espécimes

Rio Verde é o quarto município mais populoso do Estado de Goiás, e o córrego do Sapo junto com o córrego Barrinha, são os principais corpos d'água que atravessam a cidade recebendo efluentes domésticos e industriais. Consequentemente o avanço urbanístico, industrial e agropecuário trazem riscos à saúde destes corpos d'água e da sua biodiversidade aquática. Para avaliar o nível de contaminação presente no córrego do Sapo e o impacto na assembleia de peixes, foram coletados em outubro de 2018 peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), conhecidos como Tilápias-do-Nilo. Foram coletados indivíduos adultos com comprimento médio de $17,3 \pm 1,82$ cm, para evitar diferenças intraespecíficas relacionadas ao tamanho.

A espécie modelo, *O. niloticus*, possui ampla distribuição na área amostrada. São exóticas, originárias do continente africano e foram introduzidas para fins pesqueiros. Esses animais pertencentes a família dos ciclídeos são bioindicadores de má qualidade ambiental, tendo em vista que são espécies oportunistas que toleram grandes variações no hábitat e ambientes degradados (Casatti et al., 2009; Cunico et al., 2011;

Duprat, 2012). Possuem hábito alimentar onívoro, se alimentam de larvas de insetos e detritos e são usadas como modelos devido ao fácil manejo em cativeiro.

A pesca dos exemplares (n=54, 99,8g±17,3cm) ocorreu com o uso de tarrafa (malha 30 mm entre nó) onde posteriormente foram transportados ao Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano – campus Rio Verde para análises laboratoriais e incorporação à coleção científica. Os procedimentos legais foram encaminhados à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano (CEUA/IFGoiano) e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/SISBIO), tendo as devidas licenças autorizadas em ambos os órgãos (CEUA, n. 6548100418 e SISBIO, n.62687-1).

Os animais após as coletas foram divididos em dois grupos (Caixa A e Caixa B) e acondicionados em dois recipientes com capacidade de armazenamento de 500 L de água cada. A água usada nos experimentos era proveniente de poço artesiano, as quais foram armazenadas anteriormente para descloração. Dentre os cinquenta e quatro (n=54) animais coletados, dezoito (n=18) peixes foram submetidos ao tratamento inicial, que consistiu na extração imediata de amostras de sangue (40 µL) assim que eles foram retirados do córrego do Sapo. Após a coleta das amostras esses peixes foram destinados à coleção científica. Os trinta e seis (n=36) restantes foram distribuídos na caixa A e na caixa B, os quais permaneceram respectivamente por 30 e 45 dias em água limpa para uma posterior avaliação da análise sanguínea. Após o término do período de recuperação, foram colhidas amostras de sangue para cada tempo de experimento e aplicada a técnica do esfregaço sanguíneo.

Durante o período experimental, os peixes receberam ração *ad libitum* e os restos da ração não consumida foram removidos e a água renovada a cada 24 horas. A renovação da água ocorria diariamente, com água declorada após o procedimento de sifonação. Os recipientes foram cobertos com sombrite, permitindo fotoperíodo natural. Os variáveis físicos e químicos da água foram medidos uma vez ao dia durante todos os dias do experimento através da utilização de um medidor multivariáveis portátil (Bante900P) para análise de água.

Teste do Micronúcleo e Análise das Alterações Eritrocitárias

Amostras de sangue foram obtidas por meio de punção da veia caudal (Ishikawa et al., 2010) com auxílio de seringa (1 ml SR LUER SLIP Insulina)

heparinizada. Foram confeccionadas duas lâminas por animal com aproximadamente 40 µL de sangue, e aplicada a técnica do esfregaço sanguíneo. Posteriormente (Baršienė et al., 2004, 2006), as lâminas foram fixadas em metanol por 20 minutos, coradas com solução Giemsa 5%, lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. A análise citológica foi realizada em microscópio óptico (Laborana LAB-1001TB) com câmera acoplada (Laborana 3.0Mp) com magnificação de 1000x. Foram analisadas 2.000 células por animal (Rocha et al., 2016) por um único observador.

Para identificação do micronúcleo (MN) foram estabelecidos critérios tais como: 1) diâmetro menor que 1/3 do núcleo principal; 2) não refringência, a mesma intensidade de coloração do núcleo principal; 3) sem conexão ou ligação com os núcleos principais; 4) sem sobreposição com o núcleo principal; 5) não mais do que quatro MNs associados ao núcleo (Baršienė et al., 2006; Bolognesi et al., 2006; Arcaute et al., 2016). As demais alterações eritrocitárias nucleares (AENs) identificadas foram: célula com bolha nuclear, célula binucleada, célula com núcleo entalhado, célula com núcleo reniforme, célula com núcleo lobado e célula com núcleo segmentado, de acordo com Carrasco et al. (1990), Pacheco e Santos (1997), Fenech (2000) e Bolognesi et al. (2006).

Variáveis hidrológicas

As análises físicas e químicas da água foram conduzidas com um medidor multivariáveis (Bante900P) *in situ* e no laboratório durante o experimento para verificação de pH, Condutividade, Sólidos Totais Dissolvidos (TDS), Salinidade, Resistividade, Oxigênio Dissolvido (OD) e Temperatura. Em seguida, amostras de água foram coletadas no local de captura dos espécimes, armazenadas em garrafas próprias (-4°C) e enviadas para laboratório específico para análises de xenobióticos e microbiológicas. Os variáveis avaliados, tais como: coliformes totais, metais e agroquímicos, foram baseados na resolução nº 357 do CONAMA de 17 de março de 2005 e o DECRETO Nº 1745, de 06 de dezembro de 1979, da Lei 8.544, de 17 de outubro de 1978.

Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de homoscedasticidade (Levene) e de normalidade (ShapiroWilk). Os valores de MN e AENs são apresentados como média±desvio padrão. Para os dados paramétricos foi aplicado a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. O teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's foi conduzido para os dados não-paramétricos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo de acordo com Zar (1999).

3.3 RESULTADOS

Variáveis hidrológicas

Uma análise físico e química (Tabela 1 e Tabela 2) e microbiológica (

Tabela 3) da água foi realizada no córrego do Sapo e na água, em que os animais ficaram acondicionados em laboratório.

Tabela 1. Valores médios das variáveis físicas e químicas da água coletada no córrego do Sapo (*in situ*) no município de Rio Verde e dos animais acondicionados em laboratórios (*ex situ*) durante o experimento.

Variáveis	Ambiente <i>in situ</i>	Ambiente <i>ex situ</i>
Temperatura	25,1 °C	24,2 °C
pH	6,68	7,66
Oxigênio Dissolvido	376,39 mg/L	1397,83 mg/L
Condutividade	152,5 µ/s	298 µ/s
TDS	75,8 ppm	145,6 ppm
Salinidade	0,07 psu	0,14 psu
Resistividade	6,5 KΩ	3,42 KΩ

Tabela 2. Valores das variáveis químicas da água coletada no córrego do Sapo, no município de Rio Verde.

Variáveis	Resultados	Unidade	LQ	¹ CONAMA 357/2005 Classe II (VMP)	² DECRETO 1.745/1979 (VMP)
Surfactantes aniônicos	0,09	mg/L	0,001	NR	NR
Nitrogênio amoniacal total	0,28	mg/L	0,01	3,7	0,5
Alumínio dissolvido	0,09	mg/L	0,01	0,1	NR
Chumbo total	0,01	mg/L	0,01	0,01	0,05
Cobre total	0,06*	µg/L	0,001	0,009	1
Cromo total	0,01	CU	0,01	0,05	0,05
Ferro dissolvido	1,58*	mg/L	0,01	0,3	NR
Fósforo total	0,03	mg/L	0,01	NR	NR
Manganês total	0,01	mg/L	0,01	0,1	NR
Níquel total	0,05*	mg/L	0,01	0,025	NR
Zinco total	0,012	mg/L	0,01	0,18	5
Antimônio	< 0,004	mg/L	0,004	0,005	NR
Arsênio total	< 0,006	mg/L	0,010	0,010	0,05
Bário total	0,222	mg/L	0,001	0,700	1

Berílio total	< 0,0003	mg/L	0,0003	0,0400	NR
Boro total	< 0,2	mg/L	0,2	0,5	1
Cádmio total	< 0,0005	mg/L	0,0005	0,0010	NR
Cobalto total	< 0,001	mg/L	0,001	0,050	NR
Lítio total	< 0,008	mg/L	0,008	2,500	NR
Mercúrio	< 0,0002	mg/L	0,0002	0,0002	0,002
Prata total	< 0,005	mg/L	0,005	0,010	NR
Selênio total	< 0,008	mg/L	0,008	0,010	0,01
Vanádio total	< 0,01	mg/L	0,01	0,10	NR
Alaclor	< 0,1	µg/L	0,1	20,0	20
Aldrin + Dieldrin	< 0,002	µg/L	0,002	0,005	0,03
Atrazina	< 1,0	µg/L	1,0	2,0	2
Carbaril	< 0,01	µg/L	0,01	0,02	NR
Clordano Cis + Trans	< 0,02	µg/L	0,02	0,04	0,001
2 – Clorofenol	< 0,05	µg/L	0,05	0,10	NR
2,4 – D	< 0,15	µg/L	0,15	4,00	0,007
Demeton (Demeton-O + DemetonS)	< 0,02	µg/L	0,02	0,10	NR
1,2 Dicloroetano	< 0,000450	µg/L	0,000450	0,01	NR
1,1 Dicloroetano	< 0,00010	µg/L	0,00010	0,00300	NR
2,4 Diclorofenol	< 0,05	µg/L	0,05	0,30	NR
DDT (p,p’-DDT+p,p’-DDE + p,p’-DDD)	< 0,003	µg/L	0,003	0,002	0,08
Mirex	< 0,001	µg/L	0,001	0,001	NR
(Dodecacloropentaciclodecano)					
Endossulfan Alfa + Endossulfan	< 0,03	µg/L	0,03	0,06	NR
Beta + Endossulfan Sulfato					
Endrin	< 0,001	µg/L	0,001	0,004	0,001
Glifosato	< 55	µg/L	55	65	NR
Gution	< 0,004	µg/L	0,004	0,005	NR
Heptacloro Epóxido + Heptacloro	< 0,02	µg/L	0,02	0,01	0,03
Hexaclorobenzeno	< 0,001	µg/L	0,001	0,007	NR
Lindano (Gama-BHC)	< 0,01	µg/L	0,01	0,02	0,018
Malation	< 0,05	µg/L	0,05	0,10	NR
Metolacloro	< 0,1	µg/L	0,1	10,0	NR
Metoxicloro	< 0,001	µg/L	0,001	0,030	0,012
Paration	< 0,01	µg/L	0,01	0,04	NR
Pentaclorofenol	< 0,00010	µg/L	0,00010	0,009	NR
Simazina	< 0,1	µg/L	0,1	2,0	NR
2,4,5 T	< 1,0	µg/L	1,0	2,0	0,03
Tetracloroetano	< 0,000310	µg/L	0,000310	0,010000	NR
Toxafeno	< 0,01	µg/L	0,01	0,01	NR
Triclorobenzeno (1,2,3 + 1,2,4 + 1,3,5)	< 0,43000	µg/L	0,43	NR	NR
Tricloroetano	< 0,0020	µg/L	0,002	0,0300	NR
2,4,6 Triclorofenol	< 0,00010	µg/L	0,0001	0,01000	NR
Trifuralina	< 0,05	µg/L	0,05	0,20	NR
2,4,5 TP	< 1,0	µg/L	1,0	10,0	0,03

LQ: Limite de Quantificação, **VMP:** Valor máximo permitido, **NR:** Não há recomendação pela legislação. ¹Águas de Classe I, II e III - limites definidos segundo a Resolução N° 357 do CONAMA de 17 de março de 2005. ² DECRETO N° 1745, de 06 de dezembro de 1979, aprova o regulamento da Lei 8.544, de 17 de outubro de 1978, que dispõe sobre a prevenção e controle da poluição do meio ambiente. * Valores acima dos limites definidos pelo CONAMA 357/2005.

Tabela 3. Análise microbiológica da água coletada no córrego do Sapo, no município de Rio Verde.

Variáveis	Resultados	Unidade	LQ	¹ CONAMA 357/2005 Classe II (VMP)	² DECRETO 1.745/1979 (VMP)
Coliformes Termotolerantes	> 1,6 x 10 ⁴ *	NMP/100mL	1	1000	1000

LQ: Limite de Quantificação, **VMP:** Valor máximo permitido, **NR:** Não há recomendação pela legislação. ¹Águas de Classe I, II e III - limites definidos segundo a Resolução N° 357 do CONAMA de 17 de março de 2005. ²DECRETO N° 1745, de 06 de dezembro de 1979, aprova o regulamento da Lei 8.544, de 17 de outubro de 1978, que dispõe sobre a prevenção e controle da poluição do meio ambiente. * Valores acima dos limites definidos pelo CONAMA 357/2005.

Os contaminantes encontrados *in situ*, tais como: Nitrogênio Amoniacal Total, Alumínio dissolvido, Zinco Total e Bário Total, apresentaram valores acima do seu limite de quantificação e mantiveram valores dentro da resolução do CONAMA/2005. Entretanto, os Surfactantes Aniônicos apresentam valores acima do limite de quantificação, mas não há recomendação mínima na legislação. No entanto, os metais Cobre Total, Ferro Dissolvido e Níquel Total, apresentam os valores de quantificação acima do permitido pela legislação brasileira (CONAMA 357/2005). A análise microbiológica revelou que os valores de Coliformes Termotolerantes ultrapassaram drasticamente os limites de quantificação propostos pelo CONAMA. Quanto aos agrotóxicos quantificados na análise da água, todos estiveram dentro dos limites permitido pela legislação brasileira.

Teste do Micronúcleo e Análise das Alterações Eritrocitárias

Micronúcleo (Figura 1) uma série de outras anormalidades nucleares foram encontrados nos eritrócitos de peixes do córrego do Sapo (Figura 2 e Tabela 4). Contudo, não foi evidenciada diferença na frequência de micronúcleo naqueles animais obtidos inicialmente no córrego quando comparado aos animais que permaneceram por um período de recuperação ($H(2;54) = 2,00$; $p = 0,367$). No entanto, na análise de outras anormalidades eritrocitárias nucleares foi detectada diferença para células com bolha nuclear ($F(2;51) = 7,2507$; $p = 0,001$), indicando uma menor frequência dessa anormalidade celular em 45 dias de recuperação em relação ao período inicial ($p < 0,05$). Além disso, houve também menor frequência das demais anormalidades nucleares para animais que permaneceram por 30 e 45 dias livres da contaminação, comparado a análise inicial *in situ* ($p < 0,05$), para células com núcleo reniforme ($F(2;51) = 4,7326$; $p = 0,013$), células com núcleo lobado ($F(2;51) = 10,5904$; $p = 0,0001$), núcleo entalhado ($F(2;51) = 11,5708$; $p = 0,00007$), núcleo segmentado ($H(2;54) = 6,4539$; $p = 0,039$) e célula binucleada ($H(2;54) = 14,4619$; $p = 0,0007$; Tabela 4).

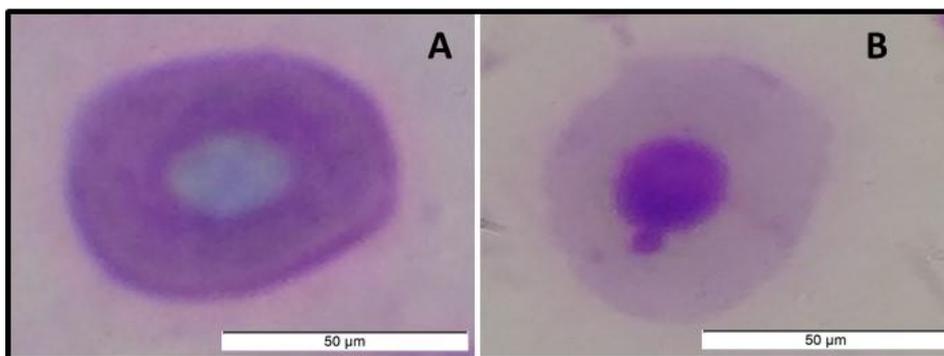


Figura 1. Fotomicrografia de: A) Célula saudável e B) Micronúcleo encontrados no sangue periférico de peixes (objetiva de 100x).

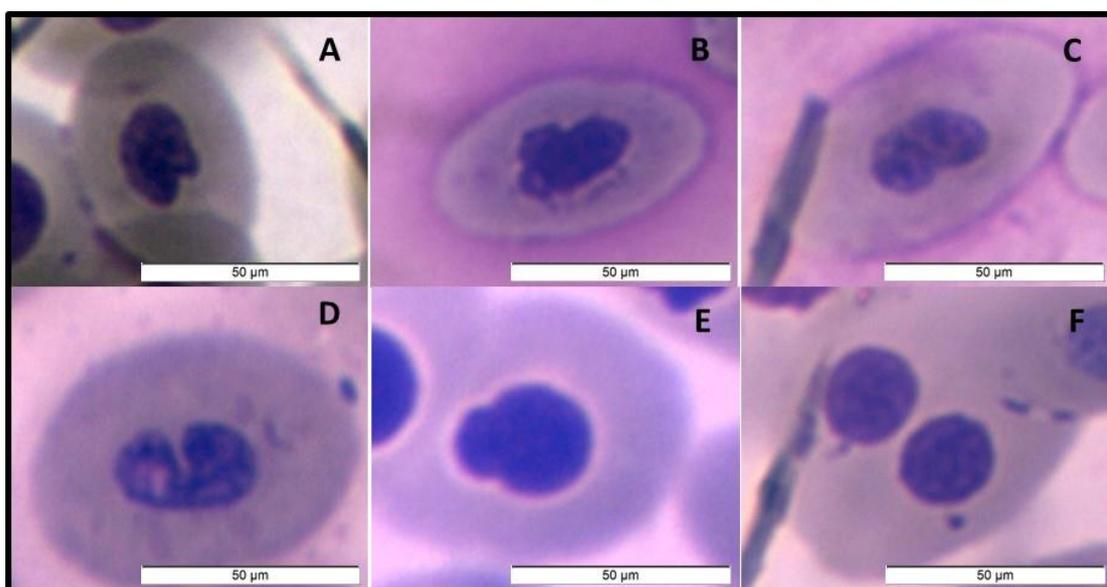


Figura 2. Alterações eritrocitárias nucleares (AENs) presentes em sangue periférico de peixes (objetiva de 100x). A) Célula com Bolha Nuclear; B) Célula com Núcleo Lobado; C) Célula com Núcleo Reniforme; D) Célula com Núcleo Entalhado; E) Célula com Núcleo Segmentado; F) Célula Binucleada.

Tabela 4. Média de MN e AENs (2000 células/animal) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* coletados no córrego do Sapo, município de Rio Verde.

MN e AENs	Tratamentos		
	Inicial	30 dias	45 dias
Micronúcleo	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,07 ^a
Bolha Nuclear	2,00±1,39 ^b	1,00±1,28 ^{ab}	0,00±0,97 ^a
Reniforme	0,47±0,32 ^b	0,15±0,29 ^a	0,00±0,30 ^a
Entalhada	0,60±0,27 ^b	0,00±0,18 ^a	0,30±0,22 ^a
Núcleo Lobado	1,00±0,36 ^b	0,53±0,42 ^a	0,30±0,23 ^a
Segmentada	0,47±0,28 ^b	0,00±0,22 ^a	0,00±0,17 ^a
Binucleada	0,60±0,37 ^b	0,00±0,18 ^a	0,00±0,16 ^a
Soma das AENs	20,00±11,22^b	8,00±8,03^a	5,00±4,67^a

Uma diferença estatística entre os tratamentos é representada por letras distintas, enquanto que letras semelhantes não indicam diferença. Teste ANOVA (post-hoc Tukey) e teste de Kruskal-Wallis (post-hoc Dunn's).

Além das análises individuais das ANEs, quando somadas também indicaram uma diferença ($p < 0,0001$; Figura 3), evidenciando maior frequência de danos nos animais investigados inicialmente no córrego. Dessa forma, realçando a recuperação dos animais em 30 e 45 dias em água livre de contaminantes.

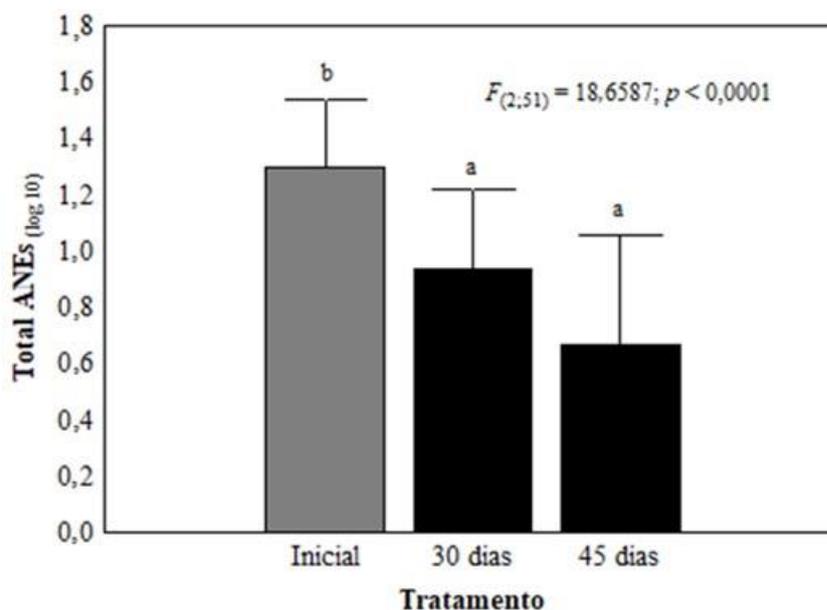


Figura 3. Frequência média da soma das alterações eritrocitárias nucleares nos peixes *Oreochromis niloticus* coletados no córrego do Sapo em Rio Verde-GO e dos peixes que permaneceram em laboratório em água limpa para avaliação da recuperação.

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi constatado que os peixes coletados *in situ* no córrego do Sapo são impactados com os contaminantes ambientais que são liberados nesse ambiente. O córrego urbano é caracterizado por despejo de esgoto doméstico, industrial e agrícola, o que favoreceu a disponibilidade de metais pesados, surfactantes e coliformes termotolerantes. Estes efluentes quando não tratados são fontes de poluição e podem causar efeitos genotóxicos em peixes. Nesse sentido, as alterações eritrocitárias nucleares detectadas nesse estudo, juntamente com uma série de relatórios, alerta para os problemas relacionado a poluição urbana e suas implicações genotóxicas e mutagênicas em peixes nesses ambientes (Adjroud, 2013; Kubrak et al., 2013; Topal et al., 2017).

Foi observado que as concentrações dos metais na água, como, Cobre total, Níquel total e Ferro dissolvido ultrapassaram os valores adotados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o que leva uma preocupação quando ocorre qualquer uso para o abastecimento humano. Uma das possíveis explicações para a presença de metais em córregos urbanos é o despejo de esgotos (Gagnon et al., 2006).

Além disso, a presença de agrotóxicos também é conhecida como potencial fonte de metais, como, o Cobre (Cu), Zinco (Zn), Cádmio (Cd) e Chumbo (Pb) (Lopes et al., 2011; Silva et al., 2017; Simonato et al., 2016). Esses níveis elevados de Cobre e Níquel são indicativos de toxicidade para os organismos que dependem do ambiente aquático.

Os pesticidas possuem elevado grau de persistência no ambiente, e tem sido detectados em águas subterrâneas e superficiais. Nesse caso, sendo Rio Verde uma cidade circundada por lavouras de soja, milho e cana-de-açúcar, ressalta-se sua potencial fonte de contaminação ao córrego do Sapo, principalmente pela uso de pesticidas nestas culturas. Estes contaminantes apresentam baixa concentração, quando encontrados em água, este efeito pode ser devido a diluição e solubilidade em água, entretanto não existe um nível seguro da presença deste produtos no ambiente aquático, tendo em vista que há espécies que podem concentrar estes compostos, podendo ocorrer magnificação (Eichelberger & Lichtenberg, 1971; Higashi, 1991; Dores & De Lamonica-Freire, 2001).

O Cobre é um metal que está relacionado à inibição de mecanismos osmorreguladores nos peixes, enquanto que o Níquel é indutor na formação de MN (Grosell et al., 2002; Okunola et al., 2015), e embora não tenhamos detectado nesse estudo a frequência de MN, de modo geral as AENs são consideradas precursoras para a formação de células micronucleadas, justificando assim a grande frequência dessas outras anormalidades encontradas no trabalho. Apesar dos metais serem essenciais para os seres vivos, seja nos processos fisiológicos quanto nos processos metabólicos, principalmente dos organismos aquáticos, quando encontrados em altas concentrações no ambiente podem ser tóxicos (Heath, 1995).

A contaminação de corpos d'água por poluentes tóxicos como os metais, podem indicar possíveis efeitos biológicos em diferentes níveis tróficos, o que poderia ameaçar a saúde das populações de organismos aquáticos (Lima et al., 2018). Além disso, os metais pesados podem ser repassados através da cadeia trófica, pelo processo de bioacumulação. Diante dessa capacidade e considerando os peixes como fonte de recursos alimentícios para o homem, a presença dessas AENs, como biomarcador morfológico e indicativo de genotoxicidade em peixes, torna-se preocupante e cria um alerta para a segurança alimentar.

Considerando a caracterização e origem genética das ANEs pontuadas no presente estudo, o núcleo lobado possui um núcleo cheio de evaginações, enquanto que, as células com formato em bolha nuclear possuem uma pequena fenda entrando no

núcleo (Ghisi et al., 2014). Para Çavas e Ergene-Gözükara (2005), a formação destas anormalidades pode estar relacionada a falhas na segregação de cromossomos emaranhados, e pela amplificação de genes através do ciclo de quebra-fusão-ponte durante a eliminação do DNA amplificado do núcleo. As alterações que apresentaram o núcleo entalhado apresentam uma abertura concêntrica se aprofundando até o centro do núcleo da célula (Ghisi et al., 2014). Esta anormalidade de acordo com Fernandes et al. (2007), pode ocorrer pela adição ou perda de um cromossomo e acontece pela falha na incorporação da tubulina para formar o fuso e a citocinese sob a ação aneugênica dos toxicantes. Esta ação pode resultar na formação de células com núcleos binucleadas. Por outro lado, as células binucleadas possuindo dois núcleos, pode indicar falhas no processo de citocinese (Ghisi et al., 2014). De acordo com Çavas et al. (2005), essa falha pode resultar no desequilíbrio genético nas células, levando à efeitos carcinogênicos. As células com núcleos em forma segmentada parecem ter mesma origem das células binucleadas. E finalmente as células com núcleo reniforme (Carrola et al., 2014), é um precursor da formação de MNs ou binucleação (Harabawy e Mosleh, 2014).

Assim constata-se que estudos elucidando o impacto de contaminantes nas assembleias de peixes a partir do teste do MN têm se intensificado nos últimos anos. Del-Guercio et al. (2017) avaliaram o impacto do tratamento de efluentes domésticos (esgoto) em *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo), revelando que o tratamento do esgoto doméstico foi satisfatório na minimização da formação de MN. Batista et al. (2016) ao avaliarem o impacto das atividades antrópicas (agricultura familiar, resíduos urbanos entre outros) sobre o rio Corrente, em Piauí, encontrou que as espécies de peixes apresentaram efeito mutagênico, alertando aos órgãos públicos da necessidade de monitorar constantemente locais com degradação ambiental, causada principalmente por descargas de esgoto urbano.

Quando analisados as variáveis da água, em ambiente *in situ* (córrego) x *ex situ* (aquário de recuperação), os resultados *in situ*, como esperado, são mais instigantes para os valores de temperatura e principalmente o pH. De acordo com Hoffman et al. (2010) e Pollo et al. (2015), estes variáveis quando alterados podem influenciar na toxicidade de diversos poluentes. Já as variáveis de sólidos dissolvidos, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido, apresentaram valores mais baixos no ambiente *in situ*. No entanto cabe considerar que o ambiente *in situ*, por estar situado em área urbanizada, recebe efluentes domésticos e industriais e esses fatores que podem aumentar os picos de vazão

do córrego devido ao escoamento superficial e lançamento ilegal de esgotos como cita Tucci e Mendes (2006). Para a avaliação da condutividade elétrica, de acordo com Esteves (2011), a mesma pode inferir sobre as alterações na composição química da água, dada a presença de concentrações de íons no ambiente. Assim, é possível detectar as fontes poluidoras a partir da coleta dos dados sobre o metabolismo dos organismos aquáticos (Da Silva et al., 2018).

Vale sublinhar que a coleta dos animais ocorreu em outubro, início da época de chuvas (média de 173mm/Clima-Data.org). Este fator é um agravante que influencia diretamente na dureza da água (Esteves, 2011). Os valores de sólidos dissolvidos estão relacionados à presença de carbonatos e bicarbonatos no ambiente, compostos que podem modificar a solubilidade de alguns metais (Da Silva et al., 2018). Assim, os valores de dureza encontrados nesse trabalho *in situ* podem influenciar diretamente no aumento da abundância de espécies tolerantes à ambientes antropizados, haja visto o recebimento de efluentes urbanos e industriais contendo compostos tóxicos (Felipe e Suárez, 2010, Sibanda et al., 2015). Com relação aos valores mais altos de dureza em ambiente de laboratório, o mesmo pode ser explicado pela própria natureza da condição experimental, cujo fluxo e escoamento de água não se mantem igual ao do ambiente natural. Quanto aos valores de oxigênio dissolvido, quando comparado a ambos os ambientes, apresentaram mais baixo no ambiente *in situ* e de acordo com Sipaúba-Tavares (1994) o oxigênio dissolvido interfere na saúde do peixe, pois sua solubilidade está relacionada a fatores como temperatura e salinidade.

Como observado nesse estudo, apenas as ANEs foram significativamente mais frequentes nos peixes coletados inicialmente *in situ* quando comparado aos animais em recuperação mantidos em água livre de contaminantes. Esses achados indicam uma significativa diminuição de danos genotóxicos constatada pela redução da frequência das anormalidades eritrocitárias nos grupos em recuperação da poluição urbana. Assim, parece haver uma resiliência da saúde dos animais em razão as condições ambientais e rearranjo do sistema de reparo genético. Embora não tenham sido observadas significativas frequência de dano mutagênico como a formação de MN, as anormalidades nucleares são consideradas uma consequência de um efeito genotóxico (Strunjak-Perovic et al., 2009). Essas anormalidades celulares podem ser irreversíveis e se manifestarem nas gerações futuras, levando à perda da diversidade de espécies em ambientes impactados.

3.5 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, o teste de micronúcleo foi aplicado em sangue periférico de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em córrego urbano. Embora tenham sido observados contaminantes oriundos de despejo de esgoto doméstico, industrial e agrícola, não foi observada significativa frequência de micronúcleo nos peixes comparados ao período de recuperação 30 e 45 dias em aquários livre de contaminantes. No entanto foi observado que a poluição de recursos hídricos urbanos favorece a susceptibilidade de formação de anormalidades eritrocitárias em peixes. Animais em exposição à xenobióticos podem recuperar a integridade celular, diminuindo a frequência de danos genotóxicos.

O fruto da nossa pesquisa pode ser utilizado em forma de educação ambiental, demonstrando o efeito dos xenobióticos nos organismos aquáticos e levantar um alerta à saúde pública, já que os animais, como os as Tilápia-do-Nilo, são frequentemente coletados pela população para consumo, além do contato direto com a água contaminada.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjroud, O. 2013. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environ Toxicol* 28(5):290-298.
- Akaishi, F.M. 2007. Evaluation of toxicity of wastewater treated and untreated into themarine bivalve *Mytilus edulis*. 2007. 133p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Arcaute, C.R.; Soloneski, S.; Larramendy, M.L. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 128, June 2016, Pages 222-229
- Arslan, O.C.; Boyacioglu, M.; Parlak, H.; Katalay, S.; Karaaslan, M.A. 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliaga Bay Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, v.94, p. 48-54.
- Baršiene, J.; Lazutka, J.; Šyvokiene, J.; Dedonyte, V.; Rybakovas, A.; Bjornstad, A.; Andersen, O.K. 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and the North Seas. *Environ. Toxicol.* 19:365-371.
- Baršiene, J.; Dedonyte, V.; Rybakovas, A.; Andreikenaite, L.; Andersen, O.K. 2006. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, 78: S99-S104.
- Batista, N.J.C.; De Carvalho Melo Cavalcante, A.A.; De Oliveira, M.G.; Medeiros, E.C. N., Machado, J.L.; Evangelista, S. R.; Da Silva, J. 2016. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere*, 164, 134–141.
- Benvindo-Souza, M.; Borges, R.E.; Pacheco, S.M.; Santos, L.R.S. 2019. Genotoxicological analyses of insectivorous bats (Mammalia: Chiroptera) in central

- Brazil: The oral epithelium as an indicator of environmental quality. *Environmental Pollution*, v. 225, p. 504-509.
- Bolognesi, C. & Hayashy, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v.26, p. 205 - 213.
- Bolognesi, C.; Perrone, E.; Roggieri, P.; Pampanin, D.M.; Sciutto, A. 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78S:S93-S98.
- Borges, R.E.; Santos, L.R.S.; Assis, R.A.; Benvindo-Souza, M.; Franco-Belussi, L.; Oliveira, C. 2019. Monitoring the morphological integrity of Neotropical anurans. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 2018, p. 1-12.
- Borges, R.E.; Santos, L.; S.; Benvindo-Souza, M.; Modesto, R.S.; Assis, R.A.; Oliveira, C. 2019. Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 76, p. 1-7.
- Carrasco, K.; Tilbury, M. 1990. Myers Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47, pp. 2123-2136.
- Carrola, J.; Santos, N.; Rocha, M.J.; Fontainhas-Fernandes, A.; Pardal, M.A.; Monteiro, R.A.F.; Rocha, E. 2014. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries-Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:6057-6068.
- Casatti, L.; Ferreira, C.P. Langeani, F. 2009. A fish-based biotic integrity index for assessment of lowland streams in southeastern Brazil. *Hydrobiologia*, v.623, p.173-189.
- Climate-Data.org. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/goias/rio-verde-4473/>. Acesso em janeiro de 2020.
- Cunico, A.M.; Allan, J.D.; Agostinho, A.A. 2011. Functional convergence of fish assemblages in urban streams of Brazil and the United States. *Ecological Indicators*, v.11, p.1354-1359.
- Çavas, T.; Ergene-Gözükara, S. 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ. Mol. Mutagen.* 46:64-70.
- Çavas, T.; Garanko, N.; Arkhipchuk, V. 2005. Introduction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate *Food Chem. Toxicol.*, 43, pp. 569-57
- Da Silva, E.B.; Da Silva Corrêa, S.A.; De Souza-Abessa, D.M. 2018. Mucociliary transport, differential white blood cells, and cyto-genotoxicity in peripheral erythrocytes in fish from a polluted urban pond. *Environ SciPollut* 25: 2683.
- Del-Guercio, A.M.F.; Christofolletti, C.A.; Fontanetti, C.S. 2017. Avaliação da eficiência do tratamento de esgoto doméstico pelo teste do micronúcleo em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 22(6), p. 1121-1128.
- Dores, E.F.G.C; De-Lamonica-Freire, E.M. 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 27-36.
- Drummond, G.M.; Martins, C.S.; Machado, A.B.M.; Sebaio, F.A.; Antonini, Y. PEIXES. IN: Machado, A.B M. (ORG.); Martins, C.S. (ORG.); Sebaio, F. (ORG.); Drummond, G.M. (ORG.); Antonini, Y. (ORG.) 2005. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para conservação sua conservação. 2º.ed. Belo Horizonte: Ed. Fundação Biodiversitas, v.1.

- Eichelberger, J.W.; Lichtenberg, J.J. 1991. Persistence of pesticides in river water. *Environ. Sci. Technol.*, 5, 541.
- Esteves, F.D.A. 2011. Fundamentos de limnologia, 3rd edn. Editora Interciência, Rio de Janeiro
- Felipe, T.R.A.; Suárez, Y.R. 2010. Caracterização e influência dos fatores ambientais nas assembleias de peixes de riachos em duas microbacias urbanas, Alto Rio Paraná. *Biota Neotrop* 10(2):144-151
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 455: 81-95.
- Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252–259.
- Gagnon, C.; Gagné, F.; Turcotte, P.; Saulnier, I.; Blaise, C.; Salazar, M.H.; Salazar, S.M. 2006. Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. *Chemosphere*, v. 62, p. 998-1010.
- Ghisi, N.C.; De Oliveira, E.C.; Fávaro, L.F.; Silva de Assis, H. C.; Prioli, A.J. 2014. In Situ Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(6), 699–709.
- Grosell M.; Wood, C.M. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry *J. Exp. Biol.*, 205, pp. 1179-1188
- Harabawy, A.S.A.; Mosleh, Y.Y.I (2014) The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104:28-35.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, second ed. C.R.C. Press: Lewia Publishers.
- Hering, D.; Carvalho, L.; Argillier, C.; Beklioglu, M.; Borja, A.; Cardoso, A.C.; Duel, H.; Ferreira, T.; Globevnik, L.; Hanganu, J.; Hellsten, S.; Jeppesen, E.; Kodes, V.; Solheim, A.L.; Noges, T.; Ormerod, S.; Panagopoulos, Y.; Schmutz, S.; Venohr, M.; Birk, S. 2015. Managing aquatic ecosystems and water resources under multiple stress: an introduction to the MARS project. *Sci. Total Environ.* 503-504, 10-21.
- Higashi, K. 1991. Relatório do XV Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas, (São Paulo), 68.
- Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A.; Cairns, Jr.J (eds). 2010. *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press, London, New York, Washington.
- Ishikawa, M.M.; De Pádua, S.B.; Satake, F.; Pietro, P.S.; Hisano, H. 2010. Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes. *Embrapa*. p.1-7.
- Jesus, I.S.; Cestari, M.M.; Bezerra, M.A.; Mello Affonso; P.R. 2016. Genotoxicity effects in freshwater fish from a Brazilian impacted river. *Bull Environ Contam. Toxicol* 96(4), p.490-495.
- Kubrak, O.I.; Husak, V.V.; Rovenko, B.M.; Poigner, H.; Kriews, M.; Abele, D.; Lushchak, V.I. 2013. Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni²⁺-induced oxidative stress. *Chemosphere* 90(3):971-976.
- Lorente, C.; Causapé, J.; Glud, R.N.; Hancke, K.; Merchán, D.; Muñiz, S.; Val, J.; Navarro, E. 2015. Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. *Sci. Total Environ.* 503-504, 151-158.
- Langeani, F., P. A.; Buckup, L. R.; Malabarba, L. H. R.; Pydaniel, C. A. S.; Lucena, R.; Rosa, R. S.; Zuanon, J. A. S.; Lucena, Z. M. S.; Britto, M. R.; Oyakawa, O. T.;

- Gomes-Filho, G. Peixes de Água Doce. In: Rocha, R.M.; Boeger, W. A. P. (Org.). 2009. Estado da Arte e perspectivas para a Zoologia no Brasil. 1ª.ed. Curitiba: Editora da UFPR. 296p.
- Lima, L.; Morais, P.; Andrade, R.; Mattos, L.; Moron, S. 2018. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*. 237. 611-624.
- Lopes, C.; Herva, M.; Franco-Uría, M.; Roca, E. 2011. Inventory of heavy metal content in organic waste applied as fertilizer in agriculture: evaluating the risk of transfer into the food chain. *Environ. Sci. Poll Res.* 18(6):918-939.
- Obiakor, M. O.; Okonkwo, J. C.; Nnabude, P. C. Ezeonyejiaku, C. D. 2012. Ecogenotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. *Journal of Animal Science Advances*, v. 2(1): p. 123-133.
- Okunola, A.A.; Babatunde. E.E.; Chinwe, D.; Pelumi. O.; Ramatu, S.G. 2015. Mutagenicity of automobile workshop soil leachate and tobacco industry wastewater using the Ames Salmonella fluctuation and the SOS chromotests *Toxicol. Ind. Health*, pp. 1-11.
- Pacheco, M.; Santos, M.A. 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38:252-259.
- Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 581.
- Rocha, C.A.M.; Lima, P.D.L.; Santos, R.A.; Burbano, R.M.R. 2009. Evaluation of genotoxic effects of xenobiotics in fishes using comet assay-a review. *Rev Fish Sci*17(2), p.170-173.
- Rocha, C.A.M.; Pessoa, C.M.F.; Rodrigues, C.A.C; Pinheiro, R.H.S, Costa, E.T.; Guimarães, A.C.; Burbano, R.R. 2016. Investigation into the cytotoxicity and mutagenicity of the Marajó Archipelago waters using *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes: Sciaenidae) as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132:111-115.
- Sibanda, T.; Selvarajan, R.; Tekere, M. 2015. Urban effluent discharges as causes of public and environmental health concerns in South Africa's aquatic milieu. *Environ Sci Poll Res Int* 22(23):18301-18317.
- Silva, Y.J.A.B.; Cantalice, J.R.B.; Nascimento, C.W.A.; Singh, V.P.; Silva, Y.J.A.B.; Silva, C.M.C.A.C.; Silva, M.O.; Guerra, S.M.S. 2017. Bedload as an indicator of heavy metal contamination in a Brazilian anthropized watershed. *C* 153(2):106-113.
- Simonato, J.D.; Mela, M.; Doria, H.B.; Guiloski, I.C.; Carvalho, P.S.; Meletti, P.C.; Silva de Assis, H.C.; Bianchini, A.; Martinez, C.B. 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *AquatToxicol* 170(1):31-41.
- Sipaúba-Tavares, L.H. 1994. Limnologia aplicada à aquicultura. FUNEP, São Paulo
- Strunjak-Perovic, I.; Coz-Rakovac, R.; Popovic, N.T.; Jadan, M. 2009. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiol Biochem*, 35:287-291.
- Topal, A.; Atamanalp, M.; Oruç, E.; Erol, H.S. 2017. Physiological and biochemical effects of nickel on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: assessment of nuclear factor kappa B activation, oxidative stress and histopathological changes. *Chemosphere* 166(1):445- 452.

- Tucci, C.E.M.; Mendes, C.A. 2006. Curso de avaliação ambiental integrada de bacia - Ministério do Meio Ambiente. Brasília: Secretaria de Qualidade Ambiental – Rhama Consultoria Ambiental. 319 p.
- Vasanthi, L.A.; Revathi, P.; Mini, J., Munuswamy; N. 2013. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. Chemosphere v. 91, p. 1156-1164.
- Vieira, C.E.D.; Costa, P.G.; Lunardelli, B.; De Oliveira, L.F.; Da Costacabrera, L.; Risso, W.E.; Primel, E.G.; Meletti, P.C.; Fillmann, G.; Buenodos Reis Martinez, C. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. Sci.Total Environ. v. 542, p. 44-56.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. 4^aed. New Jersey, Prentice-Hall. 663p.

4. CONCLUSÃO GERAL

A aplicação dos biomarcadores propostos tal como, o teste de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares se mostraram eficientes para investigar os efeitos dos contaminantes urbanos (esgotos domésticos, industriais) em peixes. Os animais após o período de recuperação apresentaram menor frequências de dano genotóxico (micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocitárias), indicando a influência dos fatores ambientais sobre a saúde de peixes, principalmente pela má qualidade da água. Assim, fica demonstrada a importância do monitoramento ecotoxicológico em peixes que habitam os cursos d'água de grandes centros urbanos, como ferramenta de auxílio à conservação dos mesmos, tendo em vista sua importância econômica.