



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

JORDANY GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DAS ÁGUAS DO RIO CAPIBARIBE, PERNAMBUCO,
BRASIL**

**RECIFE
2019**

JORDANY GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DAS ÁGUAS DO RIO CAPIBARIBE, PERNAMBUCO,
BRASIL**

Tese de Doutorado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

RECIFE
2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Silva, Jordany Gomes da

Avaliação genotóxica e mutagênica em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) das águas do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil / Jordany Gomes da Silva- 2019.

131 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Tilápia do Nilo 2. Genotoxicidade 3. Biomarcadores I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorient.) III. Título

597.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-295

JORDANY GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DAS ÁGUAS DO RIO CAPIBARIBE, PERNAMBUCO,
BRASIL**

Tese de Doutorado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Departamento de Bioquímica da UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica da UFPE

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves Rodrigues
Departamento de Zoologia do Centro de Biociências da UFPE

Profa. Dra. Juliana Ferreira dos Santos
Unidade Acadêmica de Serra Talhada – UAST/UFRPE

Dr. Janilson Felix da Silva
Departamento de Bioquímica da UFPE

Dedicatória

À minha querida mãe Maria do Socorro, meu filho Felipe Jordany e minha esposa Daniela
Gomes pelo cuidado e amor que recebo de todos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me proporciona, por todas as promessas realizadas em minha vida e pelo infinito amor e paciência que tem comigo;

À minha querida mãe, Maria do Socorro, pelo amor e dedicação que me proporciona;

Ao meu pequeno filho Felipe Jordany, o qual me traz muita alegria. Consegue me alegrar até nos dias que essa dádiva parece impossível;

Minha esposa Daniela Gomes, que tem paciência comigo e completa minha vida.

Minha amada irmã, grande exemplo de vida, minha amiga de horas difíceis, uma ajudadora.

Meu sobrinho Mathias, jovem de futuro brilhante e meu cunhado Marcio Cavalcante uma pessoa maravilhosa e de grande exemplo;

Pelo meu pai Inácio Joaquim, que mesmo distante, pôde deixar algumas lições importantes, pois até o silêncio ensina algo.

À minha família: avós, avôs, tios, tias, primos e primas que sempre vibram por cada conquista minha e por mim terem um enorme carinho;

A meu querido orientador, Ranilson Bezerra, pela dedicação e minha co-orientadora Betânia Melo, pela orientação, incentivo, amizade, carinho e pelo exemplo de pessoas generosas e competentes;

Ao professor Cristiano Chagas e todos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/CAV), minha segunda casa. Desde a graduação, mestrado e agora uma importante etapa do doutorado na UFPE/CAV.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE, pela contribuição na minha formação e pelo carinho e amizade;

Ao Centro de Biociências (CB) da UFPE, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pro-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPESQ) da UFPE, pelo suporte estrutural e financeiro no decorrer deste trabalho.

“Você faz suas escolhas, e suas escolhas fazem você”
Steve Beckman

RESUMO

Cada vez mais os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo impactos devido ao modo como esses recursos estão sendo utilizados e administrados. Grandes aglomerados populacionais nas cidades, a agricultura e a ampliação do setor industrial aumentam a concentração de compostos xenobióticos nestes ecossistemas. Desta forma, tornou-se necessário a utilização de testes que possibilitem analisar e monitorar os impactos ambientais ocorridos nestes ambientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de variáveis físico-químicas o gradiente de contaminação das águas do rio Capibaribe a fim de identificar a qualidade da água e possível ação antrópica. Adicionalmente, foi verificada, a ação genotóxica dos compostos xenobióticos em populações de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tanto, foram realizadas coletas semestrais de água e espécimes (15) de *O. niloticus* durante os anos de 2015, 2016 e 2017 em sete pontos estratégicos do rio Capibaribe, além de três barragens de abastecimento e estação de tratamento de água (ETA). Para análises físicos e química foram investigados os seguintes parâmetros: Temperatura (C°), Turbidez (NTU), Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L), pH e Oxigênio Dissolvido (mg/L), além dos metais: Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn). Para análises genotóxicas e mutagênicas foram utilizados o ensaio cometa e o teste de micronúcleo, respectivamente; além dos índices pluviométricos mensais disponibilizados pela Agência Pernambucana de Águas e Climas – APAC. Os dados demonstram que as águas do ambiente investigado estão impactadas em diferentes níveis de contaminação, apresentando valores físico-químicos acima dos estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (resolução nº 357/2005). Altos índices e frequências de danos ao DNA (micro e macro lesões) foram detectados em relação as amostras controle, em todos os períodos e locais investigados. Porém, os mais significativos ocorreram nos ambientes onde as concentrações dos metais estavam mais elevadas, indicando efeitos genotóxicos desses compostos. A maior influência do impacto ambiental causado neste ecossistema ocorre nos ambientes que recebem resíduos de empresas têxtil, esgotos dos centros urbanos e agricultura, os quais apresentaram uma carga de poluição mais significativa e conseqüentemente uma menor capacidade da manutenção da vida aquática. Essas informações poderão servir de subsídio à tomada de decisão pelos órgãos ambientais regionais responsáveis pela gestão dos recursos hídricos, uma vez que os resultados podem

auxiliar a traçar um perfil de conservação e assim gerar melhorias para resgatar a qualidade da água e vida do rio Capibaribe.

Palavras - Chave: Genotoxicidade. Biomarcadores. Ecossistema aquático. Peixes.

ABSTRACT

Increasingly, aquatic ecosystems are being impacted by the way these resources are being used and managed. Large population clusters in cities, agriculture and the expansion of the industrial sector increase the concentration of xenobiotic compounds in these ecosystems. Thus, the use of tests to analyze and monitor the environmental impacts occurred in these environments became necessary. The objective of this study was to evaluate, through physicochemical variables, the water contamination gradient of the Capibaribe River in order to identify water quality and possible anthropic action. Additionally, the genotoxic action of xenobiotic compounds in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) populations was verified. To this end, semi-annual water and specimens (15) of *O. niloticus* were collected during 2015, 2016 and 2017 at seven strategic points of the Capibaribe River, in addition to three supply dams and a water treatment plant (ETA). For physical and chemical analysis the following parameters were investigated: Temperature (C°), Turbidity (NTU), Conductivity ($\mu\text{S} / \text{cm}$), Total Dissolved Solids (mg / L), pH and Dissolved Oxygen (mg / L), besides metals: Cadmium (Cd), Lead (Pb), Copper (Cu), Chromium (Cr), Iron (Fe), Manganese (Mn) and Zinc (Zn). For genotoxic and mutagenic analyzes were used the comet assay and the micronucleus test, respectively; in addition to the monthly rainfall provided by the Pernambuco Water and Climate Agency - APAC. The data show that the waters of the investigated environment are impacted at different levels of contamination, presenting physicochemical values above those established by the National Environment Council - CONAMA (Resolution No. 357/2005). High rates and frequencies of DNA damage (micro and macro lesions) were detected in relation to control samples in all periods and places investigated. However, the most significant occurred in environments where metal concentrations were higher, indicating genotoxic effects of these compounds. The greatest influence of the environmental impact caused on this ecosystem occurs in environments that receive waste from textile companies, urban sewers and agriculture, which presented a more significant pollution load and consequently a lower capacity to maintain aquatic life. This information may serve as a basis for decision making by regional environmental agencies responsible for water resources management, as the results can help to draw a conservation profile and thus generate improvements to rescue the water quality and life of the Capibaribe River.

Key - words: Genotoxicity. Biomarkers. Aquatic ecosystem. Fish.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1 -	Processo de bioacumulação e biomagnificação de agrotóxicos.....	28
Figura 2 -	Classificação visual dos danos nos nucleóides de acordo com a quantidade e tamanho de fragmentos de DNA no arrasto. Dano 0 (sem dano); (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo)	36
Figura 3 -	Processo de formação de micronúcleo por meio dos efeitos clastogênicos e aneugênico durante a divisão celular	38
Figura 4 -	Eritrócitos normocromáticos corados em verdes; Eritrócitos policromáticos corados em vermelho; Eritrócito policromático com Micronúcleo apontado pela seta vermelha	38
Figura 5 -	Extensão do Rio Capibaribe da nascente até a sua foz (A) e suas Unidades de Análise - UA (B).....	41
Figura 6 -	Localização das principais Barragens	49
Figura 7 -	Bacia hidrográfica do rio Tapacurá	51
Figura 8 -	Área de distribuição hídrico ao reservatório de Jucazinho (A), Unidades de Análises (B), Barragem de Jucazinho (C).....	52
Figura 9 -	Mapa da localização da Barragem de Carpina (A), Barragem de Carpina, Localizada no Município de Lagoa do Carro, PE (B)	54

Artigo 1

Figura 1	Mapa de localização dos pontos de monitoramento (coleta) do trecho estudado no Rio Capibaribe no estado de Pernambuco (A- Santa Cruz do Capibaribe, B- Toritama, C- Surubim, D- Limoeiro, E- São Lourenço da Mata, F- Cavouco e G- Recife.....	64
----------	--	----

Artigo 2

Figura 1 -	Localização da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe, com a identificação das barragens estudadas. A - Barragem de Jucazinho (8°2'0"S; 36°9'0"W), B - Barragem de Carpina (7°53'28"S; 35°21'45"W) e C- Barragem de Tapacurá (8°3'21"S 35°11'14"W)	89
------------	--	----

Figura 2 -	Boxplot do ID mensal de espécimes de <i>O. niloticus</i> da barragem de Jucazinho, Carpina e Tapacurá nos anos de 2016 e 2017.....	93
Figura 3 -	Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e do Índice pluviométrico das barragens de Carpina, Jucazinho e Tapacurá nos anos de 2016 e 2017	95
Figura 4 -	Gráfico de dispersão do HPCMn e do Índice de Dano ao DNA da barragem de Carpina, Jucazinho e Tapacurá nos anos de 2016 e 2017.....	97

Artigo 3

Figura 1 -	Mapa de localização dos pontos de monitoramento (coleta) do trecho estudado no Rio Tapacurá em Vitória de Santo Antão- Pernambuco (P1- Natuba e P2 estação de tratamento de Vitória de Santo Antão)	105
Figura 2 -	Correlação da Frequência de Danos (ID) e pluviosidade do (P1) e (P2) durante o ano de 2017	109
Figura 3 -	Relação de frequência de dano, índice de dano e pluviosidade	110
Figura 4 -	Micronúcleo.....	110

LISTA DE TABELAS

Artigo 3

Tabela 1 -	Análise físico-química do Ponto 1 (P1) e Ponto 2 (P2) estratégicos do rio Capibaribe durante o ano de 2017 Análise físico-química do Ponto 1 (P1) e Ponto 2 (P2) estratégicos do rio Capibaribe durante o ano de 2017. *Valores que estão em desacordo com o CONAMA 357/2005	108
------------	---	-----

LISTA DE GRÁFICO

Artigo 1

Gráfico 1 -	Boxplot do das células micronucleadas (HPCMn) das estações chuvosa e seca de espécimes de <i>O. niloticus</i> nos sete pontos de coletas no ano de 2015 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo.....	68
Gráfico 2 -	Boxplot do Índice de Dano (ID) das estações chuvosa e seca de espécimes de <i>O. niloticus</i> nos sete pontos de coletas no ano de 2015 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo	69
Gráfico 3 -	Boxplot do das células micronucleadas (HPCMn) das estações chuvosa e seca de espécimes de <i>O. niloticus</i> nos sete pontos de coletas no ano de 2016 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo.....	70
Gráfico 4 -	Boxplot do Índice de Dano (ID) das estações chuvosa e seca de espécimes de <i>O. niloticus</i> nos sete pontos de coletas no ano de 2016 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo.....	71
Gráfico 5 -	Boxplot do das células micronucleadas (HPCMn) das estações chuvosa e seca de espécimes de <i>O. niloticus</i> nos sete pontos de coletas no ano de 2017 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo.....	72
Gráfico 6 -	Boxplot do Índice de Dano (ID) das estações chuvosa e seca de espécimes de <i>O. niloticus</i> nos sete pontos de coletas no ano de 2017 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle	

	Negativo.....	73
Gráfico 7 -	Gráfico de Análise de componentes principais (PCA) com os dados de coletas dos três anos (2015, 2016 e 2017). Por apresentarem muitas variáveis [Pluviosidade (PLUV), Índice de Dano (ID), Células Micronucleadas (HPCMn) e metais]. O gráfico PCA-Biplot, representa de forma mais didática as variações dos dados. (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE e G-Recife)	
		76

LISTA DE SIGLAS

OPs	ORGANOFOSFORADOS
CONAMA	CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE
WHO	WORLD HEALTH ORGANIZATION
CAV	CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
CNPQ	CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO
CAPES	COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
APAC	AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA
NA	ANORMALIDADE NUCLEAR
ID	ÍNDICE DE DANO
FD	FREQUÊNCIA DE DANO
MN	MICRONÚCLEO
HPCM _n	HEMÁCIAS POLINUCLEADAS
PCA	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS
UA	UNIDADE DE ANÁLISE
NC	CONTROLE NEGATIVO
MN	MICRONÚCLEO
PLUV	PLUVIOSIDADE
ETA	ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE AGUA
NTU	TURBIDEZ
MS/CM	UNIDADE DE MEDIDA DA CONDUTIVIDADE
STD	SÓLIDOS TOTAIS DISSOLVIDOS
OD	OXIGÊNIO DISSOLVIDO
CD	CÁDMIO
PB	CHUMBO
CR	CROMO
FE	FERRO

MN

MANGANÊS

ZN

ZINCO

CU

COBRE

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS	24
1.1.1	Objetivo Geral	24
1.1.2	Objetivo Específico	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS	25
2.2	METAIS PESADOS: UM DOS PRINCIPAIS POLUENTES DE AMBIENTE AQUÁTICO	29
2.3	MONITORAMENTO DE AMBIENTES AQUÁTICO IMPACTADO ...	32
2.3.1	Análises Físico-Químicas e Bioindicadores	32
2.3.2	Ensaio genotóxicos e mutagênicos	34
2.3.2.1	Teste de DNA cometa	34
2.3.2.2	Teste de micronúcleo	36
2.4	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO RIO CAPIBARIBE	39
2.4.1	Características Gerais de alguns municípios banhados pelo Rio Capibaribe	42
2.4.1.1	Município de Toritama	42
2.4.1.2	Município de Santa Cruz	43
2.4.1.3	Município de Surubim	43
2.4.1.4	Município de Limoeiro	44
2.4.1.5	Município de São Lourenço	45
2.4.1.6	Município de Vitória de Santo Antão	45
2.4.1.7	Município de Carpina	46
2.4.1.8	Município de Recife	46
2.4.1.9	Município de Recife, Riacho Cavouco	47
2.4.2	Principais barragens de abastecimento do Rio Capibaribe	48
2.4.2.1	Barragem de Tapacurá	49
2.4.2.2	Barragem de Jucazinho	51
2.4.2.3	Barragem de Carpina	53

2.5	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>OREOCHORMIS NILOTICUS</i>	55
3	RESULTADOS	58
3.1	ARTIGO 1 (MONITORAMENTO DO RIO CAPIBARIBE, PERNAMBUCO, BRASIL, POR ANÁLISE GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM <i>Oreochromis niloticus</i> E ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA)	58
3.2	ARTIGO 2 (EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS EM <i>Oreochromis niloticus</i> PROVENIENTES DE TRÊS BARRAGENS DE ABASTECIMENTO DE UM RIO URBANO NO NORDESTE DO BRASIL)	85
3.3	ARTIGO 3 (ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICA EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS SUBMETIDO A ESGOTAMENTO SANITÁRIO URBANO)	101
4	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

Devido à grande importância dos recursos hídricos, a qualidade da água é algo indispensável, pois é fato que muitos mares, rios, lagos e outras fontes de recursos hídricos encontram-se em processo de degradação, com altos índices de substâncias orgânicas e inorgânicas prejudiciais à saúde humana e ao equilíbrio ecológico.

Um dos grandes agravantes é a poluição hídrica. Os rios estão sendo poluídos por esgotos domésticos, efluentes industriais, resíduos hospitalares, agrotóxicos, entre outros elementos que alteram as propriedades físico-químicas da água (CERQUEIRA, 2015).

O rio Capibaribe é o resultado de diversas e significativas alterações ambientais ocorridas em seu processo histórico. O rio é agredido de várias formas, ocupação das suas margens, aterros, desmatamento da mata ciliar, lançamento de esgotos, de resíduos sólidos e industriais. Nas zonas canavieira, o vinhoto, lançado pela indústria do açúcar, é conhecido pela comunidade ribeirinha e pelos pescadores como a calda que mata (CPRH 2010).

Um dos maiores problemas causados pela poluição hídrica é o acometimento de doenças à espécie humana. Segundo registros da Eco-92 aproximadamente 80% de todas as doenças de origem hídrica e mais de um terço das mortes em países em desenvolvimento são causadas pelo consumo de água contaminada (IBGE, 2010).

O rio Capibaribe, enaltecido através da prosa e da poesia, cartão-postal da capital pernambucana e que, há muito, foi tido como fonte de saúde, é, hoje, o receptor de resíduos industriais e domésticos em consequência da deficiência na política de saneamento. Possui a nascente a aproximadamente 195 Km da cidade do Recife, capital do Estado, na Serra dos Campos no município de Jataúba, Agreste do Estado e banha 41 municípios do Agreste, Zona da Mata e Litoral com uma extensão total de 270 Km, da nascente até a sua foz, no Oceano Atlântico. Nos seus múltiplos usos o rio é percebido de variadas maneiras. As diferentes percepções e valores atribuídos a ele contribuem para a degradação das suas margens e poluição das suas águas (MEDEIROS, 2007; TEIXEIRA, 2007; NETO, 2008; CPRH, 2008).

Sendo assim, é de extrema importância à aplicação de biomarcadores e bioindicadores que possibilitem uma avaliação dos impactos ambientais sofridos neste ecossistema. Vários fatores determinam as condições naturais da água. Desde o contato com partículas, substâncias e impurezas do solo por meio do escoamento e infiltração da água da chuva até interferências provocadas pela atuação do homem, como a geração de resíduos domésticos ou

industriais, utilização de agrotóxicos e fertilizantes, que podem ser incorporados à água (SPERLING, 2017). Além das análises físico-químicas é recomendável adicionar outros métodos biológicos que permitam uma caracterização mais completa (POMPEU et al., 2004).

Os bioindicadores mais utilizados em biomonitoramento são aqueles capazes de distinguir entre oscilações naturais (mudanças fenológicas, ciclos sazonais de chuva e seca) e estresses antrópicos (UFMG, 2012). O uso de bioindicadores em diversos países não está apenas focado em medir a saúde ambiental do ecossistema aquático, mas também em definir o impacto potencial para o homem, especialmente o econômico (ESPINO, 2000).

Normalmente avalia-se a qualidade da água utilizando parâmetros físico-químicos, porém vários autores concordam que é importante a avaliação biológica ser incluída nos programas de monitoramento da qualidade da água. Pois estas possuem várias vantagens frente ao monitoramento tradicional (PINTO, OLIVEIRA e PEREIRA, 2010).

Os Bioindicadores são espécies sentinelas utilizadas como primeiros indicadores de efeito da contaminação de um *habitat* (ADAMS, 2002). Suas respostas aos contaminantes podem ser por acumulação de toxinas ou mudanças fisiológicas (CARNEIRO e TAKAYANAGUI, 2009). Diversos organismos aquáticos ultimamente têm sido utilizados como bioindicadores para avaliar os danos no DNA através de ensaios, como os equinoderma (JHA, et al., 2009); algas (AOYAMA; IWAHORI; MIYATA, 2003) dentre outros. Entretanto, entre estes organismos, os peixes são os mais indicados, pois sofrem o processo de bioacumulação e são sensíveis, capazes de responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações (VASCONCELOS, 2012; GOKSOYR et al., 1991). Devido a isso, os peixes são frequentemente utilizados como animais sentinelas, indicando o potencial de exposição de uma população a substâncias genotóxicas, citológicas e mutagênicas presentes na água, além do seu papel na nutrição humana, e potencial de bioacumulação de substâncias genotóxicas, bem como sua sensibilidade a baixas concentrações de mutagênicos (DEUTSCHMANN et al., 2016).

Os peixes são expostos a diversos poluentes e são peças fundamentais para a pesquisa ecotoxicológica (CARVALHO et al., 2002). Em destaque temos a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) que é uma espécie exótica que cresce e reproduz em ambientes poluídos (BIRUNGI et al., 2007). Há vários trabalhos como a utilização de peixes como bioindicadores da poluição aquática (GÜNGÖRDÜ, 2012).

Através da relação entre ambiente/bioindicador, são aplicados métodos capazes de detectar efeitos biológicos precoces originados pela exposição a agentes que causam danos ao DNA (SIMONIELLO et al., 2008). Entre os métodos utilizados, destaca-se o Ensaio Cometa amplamente utilizado como um biomarcador de danos genéticos. Segundo Monteith e Vanstone (1995), o Ensaio Cometa é uma das melhores ferramentas para o biomonitoramento ambiental. Outra forma de detecção de agentes genotóxicos é o teste de micronúcleos (MN), uma técnica confiável, rápida e menos exigente tecnicamente do que a pontuação de aberrações cromossômicas. Por isso utiliza-se muito essa técnica em pesquisas ambientais para determinar alterações genéticas nos organismos em águas contaminadas e misturas complexas (ARSLAN et al., 2015). No entanto, a utilização destas duas técnicas em conjunto vem sendo recomendada e aplicadas, pois torna a pesquisa mais robusta e eficiente.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a qualidade da água do rio Capibaribe e realizar um estudo de biomonitoramento neste ambiente verificando a ação genotóxica e mutagênica sobre população de *O. niloticus*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Realizar o biomonitoramento no rio Capibaribe verificando a ação genotóxica e mutagênica sobre populações de *O. niloticus* por meio de Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo, além de analisar a qualidade da água por meio de parâmetros físico-químico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar por meio de análises físico-químicas as águas do rio Capibaribe ao longo de um gradiente de contaminação e comparar os resultados com a legislação nacional vigente;
- Determinar as concentrações de metais presentes nas águas do rio Capibaribe;
- Avaliar os danos genômicos por macrolesões em células sanguíneas de *O. niloticus* pelo Teste de Micronúcleo;
- Avaliar o dano genômico por microlesões em células sanguíneas de *O. niloticus* pelo Ensaio Cometa;
- Estimar o índice e a frequência de danos no DNA através do Ensaio Cometa e Micronúcleo em células sanguíneas da *O. niloticus* comparando os grupos entre si em diferentes períodos de coleta;
- Realizar um levantamento dos dados pluviométricos do ecossistema investigado durante os anos de 2015 a 2017;
- Comparar os resultados obtidos entre pontos estratégicos do rio Capibaribe, além de barragens de abastecimento e estação de tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS

A água é um recurso de suma importância e indispensável ao ser humano e aos demais seres vivos (SCURACCHIO; FARACHE FILHO, 2011). Pode-se utilizar esse recurso de forma mais variada possível como: abastecimento público, atividades de irrigação agrícola, utilização nas indústrias, atividades recreativas entre outras (FARIA et al., 2013). Por essa variedade de utilizações é comum existir veiculação de contaminantes físico-químicos e microbiológicos. Para que essas alterações não ofereça riscos à saúde de seus consumidores é indispensável um monitoramento da mesma (SCURACCHIO; FARACHE FILHO, 2011). A água é um recurso essencial para a existência de vida no planeta, devido a sua influência na saúde, na qualidade de vida e no desenvolvimento humano (FALAVINHA; DEGENHARDT, 2014).

Porém ações antrópicas vêm causando grandes prejuízos ambientais, influenciando diretamente a qualidade da água, solo e ar. O termo Poluição é empregado para designar a deterioração das condições físicas, químicas e biológicas de um ambiente, afetando negativamente a vida do ambiente. A poluição ambiental antropogênica assume muitas vezes qualidades imperceptíveis e invisíveis, na forma de combinações ou misturas de poluentes capazes de se difundir no meio ambiente sem nenhuma percepção de sua presença até que as consequências mais danosas se façam perceber (ROCHA, 2009). Grandes aglomerados populacionais nas cidades, a agricultura e a ampliação do setor industrial, vem contribuindo com o aumento da concentração de compostos xenobióticos nestes ambientes (MERTZ, 1986).

Embora a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) 430/2011 estabeleça padrões ao manancial dispondo sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e utilização, assim como critérios para lançamento de efluentes nessas águas (BRASIL, 2011), são considerados como principais poluidores os efluentes domésticos, agrícolas, tendo em vista a quantidade de descarga de compostos químicos persistentes (CPRH, 2014).

Vários estudos têm relatado a presença de substâncias tóxicas em rios decorrentes do descarte inadequado de agroindústrias. Essas substâncias representam um sério e grave problema para esses ambientes e apesar da legislação vigente, o descarte inapropriado ainda continua ocorrendo (CLAXTON et al., 1998; WHITE e RASMUSSEN, 1998). A situação é agravada porque esses agentes podem alcançar áreas distantes de onde foram originalmente usados e/ou descartados. Quando utilizados em agriculturas próximas a ecossistemas aquáticos, os agentes tóxicos podem alcançar as correntes de água através das chuvas, percolação no solo (chegando aos lençóis freáticos), volatilização dos compostos aplicados, formação de poeiras do solo contaminado (COOPER, 1993), bem como da pulverização dos pesticidas que são transportados por correntes aéreas, depositando-se assim no solo e na água. Este fato pode acarretar em uma redução na qualidade de vida nesses ambientes, diminuindo consequentemente a biodiversidade local. Adicionalmente, essas substâncias podem afetar os humanos através da ingestão de organismos presentes em ambientes impactados (VON BURG e LIU, 1993).

A mudança no processo tradicional da produção agrícola ocorridas durante a Revolução Verde (1940-1970), período também conhecido como a modernização da agricultura nacional também contribuiu com a produção de agrotóxicos. Começou o processo de mecanização rural, a seleção de sementes mais produtivas e o uso de fertilizantes e agrotóxicos (PINOTTI e SANTOS, 2013). Com isso o mercado ficou muito atrativo para várias empresas. Tornando assim o Brasil um ótimo lugar para instalação dessas novas indústrias (PELAEZ et al., 2011), sendo o Brasil um dos países que mais utilizam agrotóxicos na produção agrícola, assumindo no ranking mundial o sexto lugar de importação de agrotóxicos para destinação nas lavouras (ANVISA, 2013).

A utilização descontrolada de agrotóxicos pode causar impactos no ecossistema e na saúde humana (BEDOR, 2008). O uso inapropriado dessas substâncias químicas pode fazer com que populações, até mesmo as que não estão vinculadas diretamente com a cadeia produtiva dessas substâncias, sejam expostas em função de contaminação ambiental ou por alimentos, tornando o uso de praguicidas uma questão importante de saúde pública (KOIFMAN e KOIFMAN, 2003; CARNEIRO et al., 2015).

É importante analisar que devido o aparecimento tardio de males na saúde do homem causados pelo DDT (só apareceram cerca de 20 a 30 anos depois do seu uso intenso) os indivíduos pensam que não existe reações no corpo (PIMENTEL et al., 2006).

Isso acontece porque os resíduos químicos que permaneceram no meio ambiente e na cadeia alimentar podem ser bioacumulados, biomagnificados e biotransformados. A bioacumulação é o acúmulo ao longo do tempo em organismos vivos, em concentrações maiores do que o das águas ou dos alimentos consumidos; já a biomagnificação é o acúmulo progressivo observado em cada nível da cadeia alimentar; e a transformação da substância em outras, no organismo, é conhecida como biotransformação (BEDOR, 2008).

O ambiente aquático também se depara com poluentes provenientes de resíduos têxtil. A indústria têxtil no Brasil é a 5ª maior produtora mundial de têxteis (ABIT, 2016). Para suas operações é importante um alto consumo de água, além da liberação de vários corantes sintéticos, causando vários descontroles ambientais (HORVAT et al., 2012). A consequência desses descarte têxteis sem tratamento nos ambientes aquáticos é a diminuição do oxigênio dissolvido, além da pouca entrada de luz solar nas camadas mais profundas, pois os corantes dificultam essa passagem. Essas interferências modificam a atividade fotossintética do meio, causando prejuízo para fauna e flora aquática (LALNUNHLIMI; KRISHNASWAMY, 2016).

Uma média de 10 mil corantes sintéticos são produzidos em escala industrial, sendo que aproximadamente 2 mil encontram-se disponíveis para o segmento têxtil, onde sua utilização é extensivamente grande (DALLAGO et al., 2005; RODRIGUES, 2003). Uma média de 10% destes corantes são descartados em efluentes, causando diversos problemas ambientais (GHAZI MOKRI et al., 2015).

Os corantes apresentam uma ação mutagênica, por apresentam em sua constituição química grande quantidade de anéis aromáticos, ligações azóicas e grupos sulfonados, causando assim suscetíveis a acumulação em plantas e outros organismos aquáticos (ARAVIND et al., 2016).

O crescimento urbano tem sido acompanhado por um ciclo de contaminação com os esgoto doméstico/industrial e o esgoto pluvial. Esse processo ocorre em razão de: Despejo sem tratamento dos esgotos sanitários nos rios; O esgoto pluvial transporta grande quantidade de poluição orgânica e de metais que atingem os rios nos períodos chuvosos; Contaminação das águas subterrâneas por despejos industriais e domésticos, por meio das fossas sépticas, vazamento dos sistemas de esgoto sanitário e pluvial (TUCCI, 2008).

A urbanização do solo sem controle do seu impacto sobre o sistema hídrico gera uma média diária de 10 bilhões de litros de esgoto que poluem rios, lagos, lençóis subterrâneos e

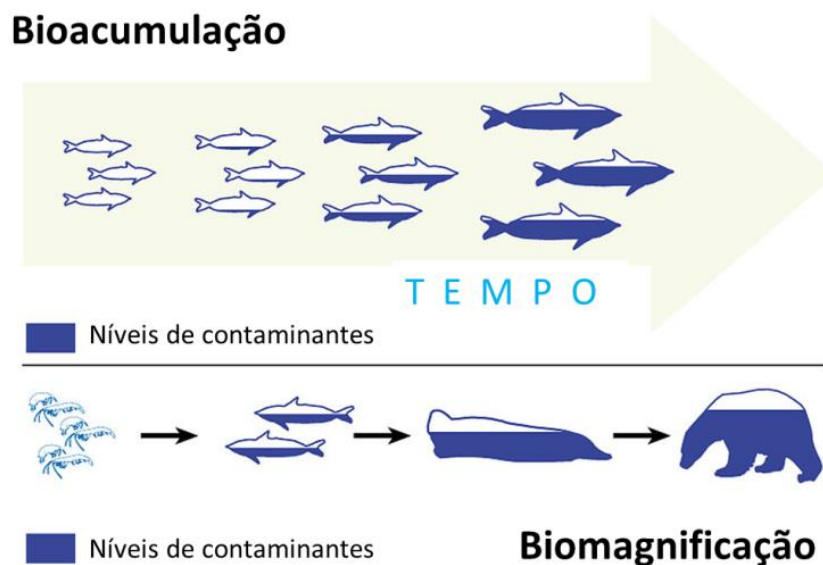
áreas de mananciais (INFOCEFET, 2009). A falta de tratamento de esgoto é o maior fator da poluição dos rios (SILVA, 2009).

As expressões bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação que juntas descrevem um processo pelo qual a concentração de poluentes nos animais aumenta na direção do topo da cadeia alimentar é de suma importância seu entendimento.

Bioconcentração é o processo que causa o aumento da concentração de uma substância química em um organismo aquático, em relação a sua concentração na água, devido a incorporação através de sua absorção unicamente pela água, a qual pode ocorrer pela superfície respiratória e/ou pela pele. Biomagnificação é acumulação de uma substância na biota em toda a extensão da cadeia alimentar através da alimentação e Bioacumulação é o somatório destes dois processos (CPRH, 2016).

Figura 1 mostra uma ilustração a respeito da bioacumulação e da biomagnificação. A bioacumulação é evidenciada em um organismo, neste caso peixes, que podem acumular moléculas químicas em seus tecidos com o passar do tempo. O processo de biomagnificação pode ser visto na cadeia alimentar quando o consumidor primário se alimenta do produtor e incorpora os resíduos de agrotóxico deste. Com o consumo ao longo da vida, a quantidade de agrotóxico acumulado na gordura corporal vai sendo multiplicada a cada ingestão. O mesmo acontecerá com os demais consumidores, sendo a máxima concentração no último elo da cadeia.

Figura 1: Processo de bioacumulação e biomagnificação.



Fonte: <https://implante.institute/blog/bioacumulacao-e-biomagnificacao/302>

2.2 METAIS PESADOS: UM DOS PRINCIPAIS POLUENTES DE AMBIENTES AQUÁTICOS

Podemos definir como metais pesados, o grupo dos elementos químicos que apresentam densidade atômica maior que 5g cm^{-3} ou que possuem número atômico maior que 20 (MARQUES et al., 2002). Alguns desses elementos, como Sódio (Na), Magnésio (Mg), Potássio (K), Cálcio (Ca), Zinco (Zn) e Cobre (Cu), são microelementos essenciais para várias formas de vida, pois são necessários para o funcionamento de algumas rotas metabólicas (AGUIAR et al., 2002). Entretanto, o excesso ou carência desses elementos pode levar a distúrbios nos organismos, e em casos extremos, até a morte (VIRGA et al., 2007).

Os metais pesados participam do ciclo ecobiológico global, derivam de inúmeras fontes e são transportados dinamicamente através da atmosfera, solo e águas e por não serem biodegradáveis, podem permanecer no ambiente por longos períodos (LINDE et al., 1996). Nos sistemas aquáticos podem ser introduzidos como resultado de processos naturais, como intemperismo, erosão e erupções vulcânicas (FOSTER; CHARLESWORTH, 1996). Entretanto, nas últimas décadas, o aumento da urbanização e industrialização tem contribuído para o grande aumento desses contaminantes no meio ambiente, em todo o mundo (FASHOLA et al., 2016).

O ferro e cobre em seu estado de oxidação reduzido podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais são capazes de oxidar diversas biomoléculas a partir de abstração de um hidrogênio da desoxirribose ou de modificações nas bases nitrogenadas do DNA (JIANG, Q. et al, 2007).

Na maioria das vezes o ambiente aquático é o destino final da grande quantidade e variedade de contaminantes químicos exógenos liberados pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e industriais (ATLI e CANLI, 2007). A grande proporção dos contaminantes aquáticos de origem antropogênica é composta de substâncias potencialmente genotóxicas e carcinogênicas (ATIENZAR e JHA, 2004). Os metais podem ser naturalmente incorporados aos sistemas aquáticos em pequena escala, por meio de processos geoquímicos. Esses metais, quando ocorrem em concentrações mais elevadas, tornam-se tóxicos para todos os organismos vivos induzir danos ao material genético (PRÁ et al., 2006).

O chumbo é um metal relativamente abundante na crosta terrestre, tendo uma concentração média entre 10 e 20 mg/Kg. As maiores fontes naturais de chumbo são emissões vulcânicas, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (CASTRO-GONZÁLEZ e MÉNDEZ-ARMENTA, 2008).

Ele pode ser encontrado em suas formas orgânicas e inorgânicas, estando presente em solos, água e alimentos. Pode ser considerado um dos mais importantes problemas de saúde (CASTRO-GONZÁLEZ e MÉNDEZ- ARMENTA, 2008). Níveis ambientais de chumbo aumentaram mais de 1000 vezes ao longo dos últimos três séculos como resultado da atividade humana sendo que o maior aumento ocorreu entre os anos 1950 e 2000 (ATSDR, 2008).

O chumbo é capaz de promover mutação, aberrações cromossômicas, câncer e defeitos congênitos (VALVERDE et al., 2002). Os mecanismos moleculares da toxicidade do chumbo não são totalmente compreendidos, mas evidências indicam que ele pode agir pela competição com cátions endógenos, como o cálcio e o zinco, por sítios de ligação em proteínas (BARCISZEWSKA et al., 2005). Esta substituição pode promover mais alterações nestas proteínas e, conseqüentemente, pode alterar o metabolismo celular e induzir distúrbios na transcrição gênica (WOZNIAK e BLASIAK, 2003). A presença de chumbo no núcleo pode resultar em efeitos de interação com proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, mecanismos indiretos de danos à molécula de DNA foram relatados, como por exemplo, a inibição do reparo da molécula de DNA (JOHNSON, 1998). Outros estudos mostraram, também, que o chumbo pode gerar espécies reativas de oxigênio (PRÁ et al., 2006), que interagem com a molécula de DNA, causando danos a mesma. Estudos de genotoxicidade sobre os compostos metálicos e seus compostos orgânicos são muito importantes, especialmente na investigação dos efeitos destes compostos em meio aquático, onde tendem a se acumular (FERRARO et al., 2004).

Os peixes são capazes de reter e absorver metais pesados dissolvidos na água através de processos ativos ou passivos. Diferentes tecidos geralmente apresentam diferente capacidade de acumular metais pesados.

O zinco é um dos elementos mais comuns na Terra e pode ser encontrado no ar, no solo, na água e está naturalmente presente nos alimentos (AZEVEDO e CHASIN, 2003). O zinco é muito utilizado na produção de: borrachas, herbicidas e inseticidas, cosméticos,

fertilizantes, tintas para tingimento de tecidos, mineração e na indústria de medicamentos (MAHAN, 1995).

No ambiente aquático, a toxicidade do zinco é modificada por fatores ambientais como dureza da água, oxigênio dissolvido e temperatura (MOORE e RAMAMOORTHY, 1984).

O manganês pode ficar depositado junto ao sedimento no fundo, bioacumulando-se pelos níveis tróficos inferiores (SARIC e LUCCHINI, 2007). Tem sua finalidade principal na indústria como aditivo no aço, sendo utilizado também em ligas metálicas, pilhas e baterias secas, em fertilizantes, compostos orgânicos para secagem de tintas e reagentes químicos (SILVA, 2002).

O manganês é um metal que ativa diversas enzimas, as quais são necessárias para a síntese da hemoglobina, crescimento, reprodução, formação óssea, produção e excreção de insulina e prevenção de dano celular. A exposição aguda a este metal pode causar a morte e a exposição crônica apresenta sintomas neurológicos (CSUROS, 2002). Nos últimos anos têm surgido relatos de associação da ingestão crônica de níveis elevados de manganês com deficiência intelectual de crianças e aumento da mortalidade infantil, bem como sua associação com a Doença de Parkinson (HAFEMAN et al., 2007; FINKELSTEINS et al., 2008; STEPENS et al., 2008).

A concentração do cromo trivalente nos vários tecidos pode causar danos cromossômiais e aberrações pela ação clastogênica da ação do metal no DNA (LAMSON e PLAZA, 2002).

O cádmio é prioridade na lista de substâncias perigosas da ATSD (Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças), Pois segundo a agência tem uma classificação como compostos de ameaça significativa à saúde humana, devido a sua toxicidade conhecida e a potencial exposição humana a essas substâncias (ATSRD, 2011). Além disso, o cádmio também é classificado como carcinogênico pela IARC (Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer) (Waalkes, 2003).

Podemos destacar o cádmio e chumbo pela sua presença na contaminações do ambiente aquático, podendo causar problemas de intoxicação ao homem e demais organismos. Estes elementos são capazes de reagir com moléculas e com ligantes presentes nas membranas celulares, conferindo-os as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios metabólicos dos seres vivos (TAVARES; CARVALHO, 1992).

2.3 MONITORAMENTO DE AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS

Devido à grande importância dos recursos hídricos, a qualidade da água é algo indispensável, pois vários mares, rios, lagos e outras fontes de recursos hídricos encontram-se em processo de degradação, com altos índices de substâncias orgânicas e inorgânicas prejudiciais à saúde humana e ao equilíbrio ecológico. Essa poluição pode ser devido a vários fatores como: despejo de esgotos industriais, esgotos domésticos e agrotóxicos provenientes da agricultura, produtos químicos oriundos de atividades de ensino e pesquisa, dentre outros (FRINHANI e CARVALHO, 2010) e, precisa, portanto, ser monitorada. Existem vários métodos de análises da qualidade da água. Abaixo encontram-se algumas alternativas de monitoramento:

2.3.1 Análises Físico-químicas e Bioindicadores

Umas das formas de avaliar a qualidade das águas superficiais é a utilização de parâmetros, os quais representam as suas características físicas, químicas e biológicas. Esses parâmetros são indicadores da qualidade da água e constituem impurezas quando alcançam valores superiores aos estabelecidos para determinado uso (CONAMA, 2005).

Durante muito tempo, o monitoramento e análise da qualidade da água foram realizados apenas por meio de características químicas, físicas e microbiológicas. Os parâmetros físicos [CE (condutividade elétrica), cor, temperatura e turbidez] e químicos [OD (oxigênio dissolvido), nitrogênio total e amoniacal, fósforo, pH, TDS (totais de sólidos dissolvidos), entre outros] permitem apontar e quantificar os elementos presentes, identificar os efeitos de suas propriedades e compreender sua relação com os impactos antrópicos (PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011). Porém, embora estas formas de biomonitoramento retratem o “status” de um ecossistema, as alterações mais sutis não são detectadas, tornando estes métodos insuficientes para uma análise ambiental completa (ARIAS et al., 2007).

Segundo RAMSDORF et al., (2012), o aumento da exposição ambiental a agentes químicos potencialmente tóxicos tem propiciado um maior interesse no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos e terrestres, mediante a correlação entre o perfil físico-químico da água e o emprego de ensaios de genotoxicidade, os quais devem ser incluídos como

parâmetros adicionais nos programas de monitoramento da qualidade de água, uma vez que eles são ferramentas sensíveis e valiosas na detecção da presença destes contaminantes em ambientes aquáticos.

Assim, fez-se necessário a utilização de organismos para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações antrópicas (MATTHEWS et al., 1982). Diversos testes de curta duração têm sido desenvolvidos utilizando microrganismos, insetos, plantas e animais para identificar agentes que promovam danos genéticos (HOUK, 1992). Estes organismos podem ser definidos como bioindicadores, pois respondem biologicamente em nível de organismo ou ainda em níveis inferiores, como órgãos, tecidos e/ou células, a um ambiente químico, através de alterações bioquímicas, fisiológicas e/ou comportamentais (CAPELA, 2001).

O monitoramento de ecossistemas aquáticos, utilizando bioindicadores, apontam aspectos da condição ambiental, isso se torna um importante componente do gerenciamento de qualidade de um ambiente. As lesões celulares que causam mutagenicidade podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos. Essas alterações prejudicam processos vitais, como a replicação do DNA e a transcrição gênica, causando alterações cromossômicas e formação de processos cancerosos e morte celular. Por serem lesivas ao material genético, essas substâncias são chamadas de genotóxicas (DA COSTA e MENK, 2000).

Segundo o Decreto-Lei nº 98/2010 de 11-08-2010, uma mutação consiste numa alteração permanente da quantidade ou da estrutura do material genético de um organismo. As alterações podem envolver um único gene, um bloco de genes ou um cromossoma inteiro. Os efeitos que envolvem genes isolados podem ser consequência de efeitos sobre uma única base do DNA (mutações pontuais) ou de grandes modificações no gene, incluindo deleções. Já os efeitos num cromossoma inteiro podem envolver modificações estruturais ou numéricas. Os agentes que causam mutações são considerados genotóxicos. Porém VOGEL (1989) já alertava nem todos os agentes genotóxicos são mutagênicos.

Existem vários tipos de bioensaios, os quais tem a finalidade de identificar efeitos biológicos precoces. Esses testes têm função de monitorar populações expostas a um grande número de agentes químicos que aumentem a velocidade de mutação genética interferindo na função dos ácidos nucleicos (ASHBY, 1988; GARRETT et al., 1992; DA SILVA AUGUSTO et al., 1997; SIMONIELLO et al., 2008). Abaixo encontram-se alguns dos métodos frequentemente utilizados.

2.3.2 Ensaios Genotóxicos e Mutagênicos

2.3.2.1 Teste de DNA Cometa

O ensaio cometa, também conhecido também conhecido como SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis) corresponde a uma análise que tem a finalidade de detectar dano ao DNA em células individualizadas. As células nas quais se deseja verificar o dano ocasionado ao seu DNA, são suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e então colocadas em lâminas de vidro para microscopia as quais foram previamente recobertas com uma camada de agarose normal. As lâminas contendo as células são então submetidas a uma corrida de eletroforese (SPEIT; HARTMANN, 1999).

O princípio desta técnica é que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo, pois pelo seu tamanho não passa na malha do gel de agarose (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração adequada). O Teste de DNA Cometa é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA. As células com danos no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa, pois os fragmentos conseguem passar pela malha do gel de agarose (HARTMANN, 1999). O princípio da técnica é simples: as células são incluídas em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda. O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para migrar (SILVA et al., 2003).

O Teste Cometa é uma técnica rápida, simples e sensível, de baixo custo para mensurar, analisar as lesões, monitorar o dano e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos. (SINGH et al., 1988; TICE, 1995; SILVA et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; PAVÃO et al., 2007). Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; COLLINS et al. 2008).

Todo experimento é fotossensível, sendo necessário que todo procedimento após a coleta do material ocorra em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca). A análise ocorre em microscópio de epifluorescência, onde são analisadas as células segundo o comprimento da cauda de fragmentos. Elas podem ser classificadas em cinco classes: 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo), ver a Figura 02.

Desta forma, os valores obtidos através do índice de dano (ID) para cada indivíduo pode variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4), obtendo-se o ID total. Também pode ser analisado a frequência de danos (FD%) que é calculado com a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total).

Este tipo de ensaio tem sido frequentemente proposto para estudos de toxicologia genética devido às suas vantagens e peculiaridades quando comparado a outros testes que detectam substâncias genotóxicas sendo, portanto, uma ferramenta fundamental de investigação em estudos de reparo de DNA, biomonitoramento ambiental e teste de genotoxicidade (VILCHES et al., 2008).

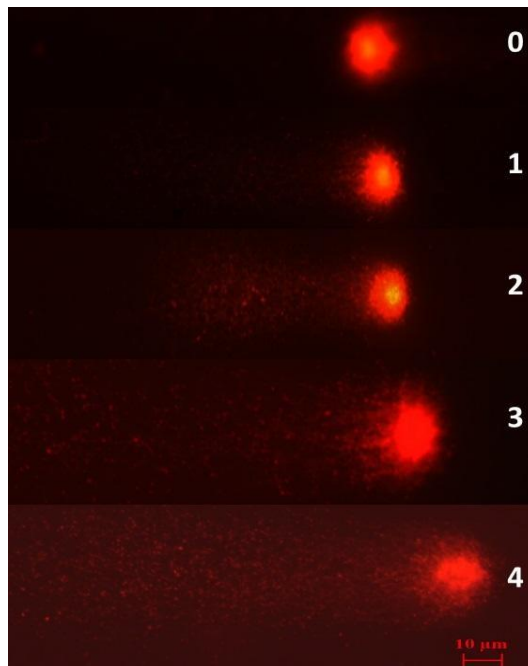
Em ambientes aquáticos impactados, esse teste tem sido utilizado para verificar a contaminação de rios que recebem efluentes domésticos, industriais e de influência agrícola, por meio da observação de danos de DNA em organismos bioindicadores expostos às águas poluídas. Por isso, muitos estudos têm utilizado peixes como bioindicadores de poluição na avaliação de danos de DNA, pois eles acumulam direta e indiretamente poluentes e possuem uma resposta aos mesmos (VILCHES et al., 2008).

A sua alta sensibilidade a vários tipos de danos de DNA é uma das duas grandes importâncias (BUCKER et al., 2006). Precisa de baixo número de células para realização do teste, tem uma mensuração de danos em células individuais e realização em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (LEE e STEINERT, 2003). É muito aplicado esse teste em estudos, com notório sucesso (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; PAVÃO et al., 2007).

Desta forma, diversos trabalhos na literatura já utilizam a técnica em vários organismos, como *Drosophila* (MUKHOPADHYAY et al., 2004; GAIVÃO e SIERRA, 2015), crustáceos (MOURA et al., 2015), moluscos (VILLAR et al., 2015), peixes (MATOZO et al., 2015; MOURA et al., 2015), anfíbios (GONÇALVES et al., 2015), cágado (SILVA,

2015), roedores (MENEGUETTI e FACUNDO, 2015; BALDISSERA et al., 2016), dentre outros.

Figura 2: Classificação visual dos danos nos nucleóides de acordo com a quantidade e tamanho de fragmentos de DNA no arrasto. Dano 0 (sem dano); (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo).



Fonte: Giselly, Tallita 2016.

2.3.2.2 Teste de Micronúcleo (MN)

O teste de MN é um biomarcador reconhecido de genotoxicidade ambiental, muito utilizado para análise da ação de compostos mutagênicos e de contaminantes químicos (AL-SABTI, 1986; METCALF, 1988). Esse teste corresponde a um método simples, confiável, sensível e de baixo custo para analisar impacto biológico em ambientes aquáticos (RUSSO et al., 2004).

Os estudos de MN iniciaram em 1900 por Howel no citoplasma de eritrócitos, que inicialmente receberam o nome de “fragmento de material nuclear”, proposto por Jolly. Só em 1970, Boller e Schmid, passaram a chamar esses fragmentos de micronúcleos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

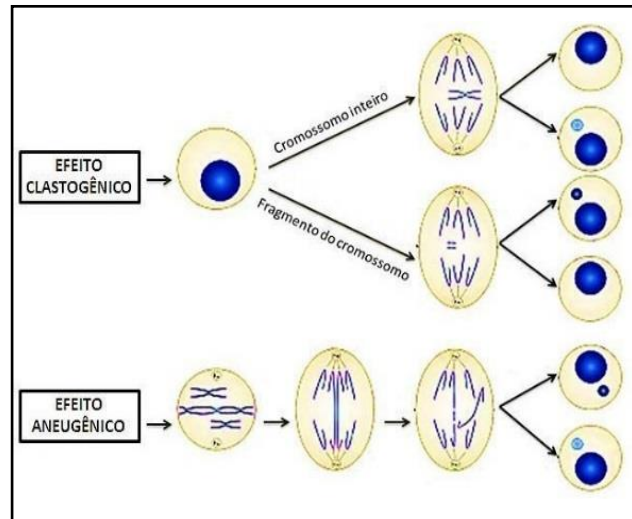
Em 1973, Von Ledebur e Schmid desenvolveram um procedimento em medula óssea de roedores (in vivo) para analisar danos citogenéticos através desses micronúcleos (HEDDLE et al., 1983; RABELLO-GAY, 1991). Já em 1976 Heddle adaptou o procedimento inicial para utilizá-lo em estudos in vitro (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Esse teste foi adaptado para ser aplicado em peixes apenas em 1982 por HOOFFMAN e RAAT. Em seus estudos esses autores demonstraram que por ser os peixes organismos que apresentam cromossomos pequenos, em grande quantidade, e com baixo índice mitótico, a aplicação do teste na maioria das espécies tornou-se extremamente vantajoso quando comparado a outros testes mutagênicos (KLIGERMAN, 1982).

Alem disso, os eritrócitos de peixes são apropriados para a aplicação deste teste por formarem micronúcleos de fácil contagem e pelo fato do sangue periférico ser de fácil obtenção (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Em 2006, UDROIU, evidenciou que o teste de Micronúcleo realizado com o sangue periférico de peixe é particularmente indicado para avaliar casos de exposição crônica ao meio aquático contaminado por fatores físico-químico e biológico.

Define-se micronúcleo como fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula. Este fenômeno acontece pela danificação de alguns agentes em diferentes cromossomos, induzindo quebras (clastogênese), ou afetando o fuso mitótico, levando à perda de cromossomos inteiros (aneugênese) (NATARAJAN, 2002; MATEUCA et al., 2006; FENECH, 2007; 2010). O fragmento ou o cromossomo inteiro fica no citoplasma da célula e é envolvido por um envoltório nuclear, adquirindo características semelhantes às do núcleo principal (FENECH et al., 2011), ver Figura 3.

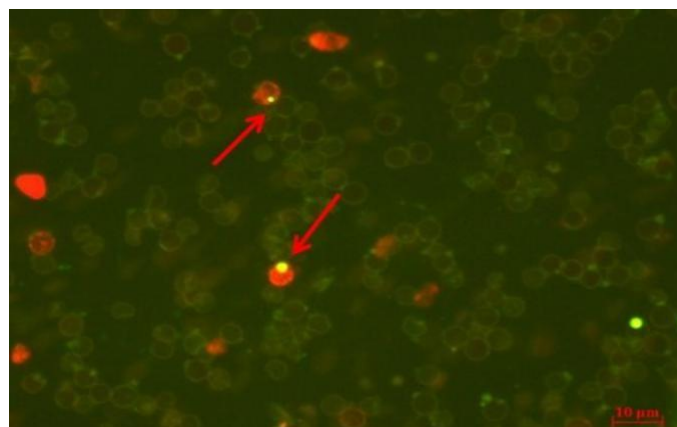
Figura 3: Processo de formação de micronúcleo por meio dos efeitos clastogênicos e aneugênicos durante a divisão celular.



Fonte: <http://goo.gl/fq0t4U>

Para FENECH (2000), quando uma estrutura de material genético presente no citoplasma apresentar: tamanho entre 1/6 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal; envoltório nuclear visivelmente distinto; não apresentar nenhuma conexão com o núcleo principal; ter intensidade de coloração similar ou igual à do núcleo principal e não ser birrefringente essa estrutura corresponde a um micronúcleo (Figura 5).

Figura 4: Eritrócitos normocromáticos corados em verdes; Eritrócitos policromáticos corados em vermelho; Eritrócito policromático com Micronúcleo apontado pela seta vermelha.



Fonte: Rocha (2015).

Um dos passos no desenvolvimento de alguns tipos de câncer é a perda de um cromossomo ou a sua disjunção (FENECH, 2000). Com a aplicação do teste de Micronúcleo conseguimos avaliar esses eventos. Dessa forma o ensaio tornou-se uma ferramenta importantíssima nos estudos toxicológicos, podendo ter aplicabilidade em várias áreas (KIRSCH-VOLDERS, 1997). Por essa importância ele tem sido aceito internacionalmente como um dos ensaios necessários para o registro de novos produtos químicos lançados no mercado, dentre eles os agrotóxicos (CHOY, 2001).

Os testes de micronúcleos são amplamente utilizados em ensaios de genotoxicidade porque é simples, confiável, sensível, de baixo custo, eficiente e pode ser realizado em qualquer população celular em proliferação (HAYASHI et al., 1998; KRISHNA e HAYASHI, 2000), além disso, esses testes podem ser aplicados in vivo e in vitro (KRISHNA e HAYASHI, 2000; SEVERIN et al., 2010). Vários trabalhos demonstram a eficiência dos micronúcleos na detecção de efeitos mutagênicos (FLORES e YAMAGUCHI, 2009; BATISTA e CAMPOS, 2015). Alguns estudos têm relacionados os micronúcleos aos danos na saúde humana e ambiental causados pelo uso de agrotóxicos (MORON et al., 2006; KUNST et al., 2014; CARBAJAL-LÓPEZ et al., 2016).

Segundo Carrasco et al (1990), as classificações das alterações nucleares são em quatro categorias: a) Blebbed: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, ainda ligada ao núcleo, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. b) Lobbed: núcleos com evaginações mais largas e não tão definidas como as descritas para blebbed. c) Vacuolated: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos ausentes de qualquer material visível no seu interior d) Notched: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Já Fenech (2000) acrescentou mais uma alteração na classificação. O qual chamou de e) Binúcleo: núcleos em número de dois, bem definidos.

2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO RIO CAPIBARIBE

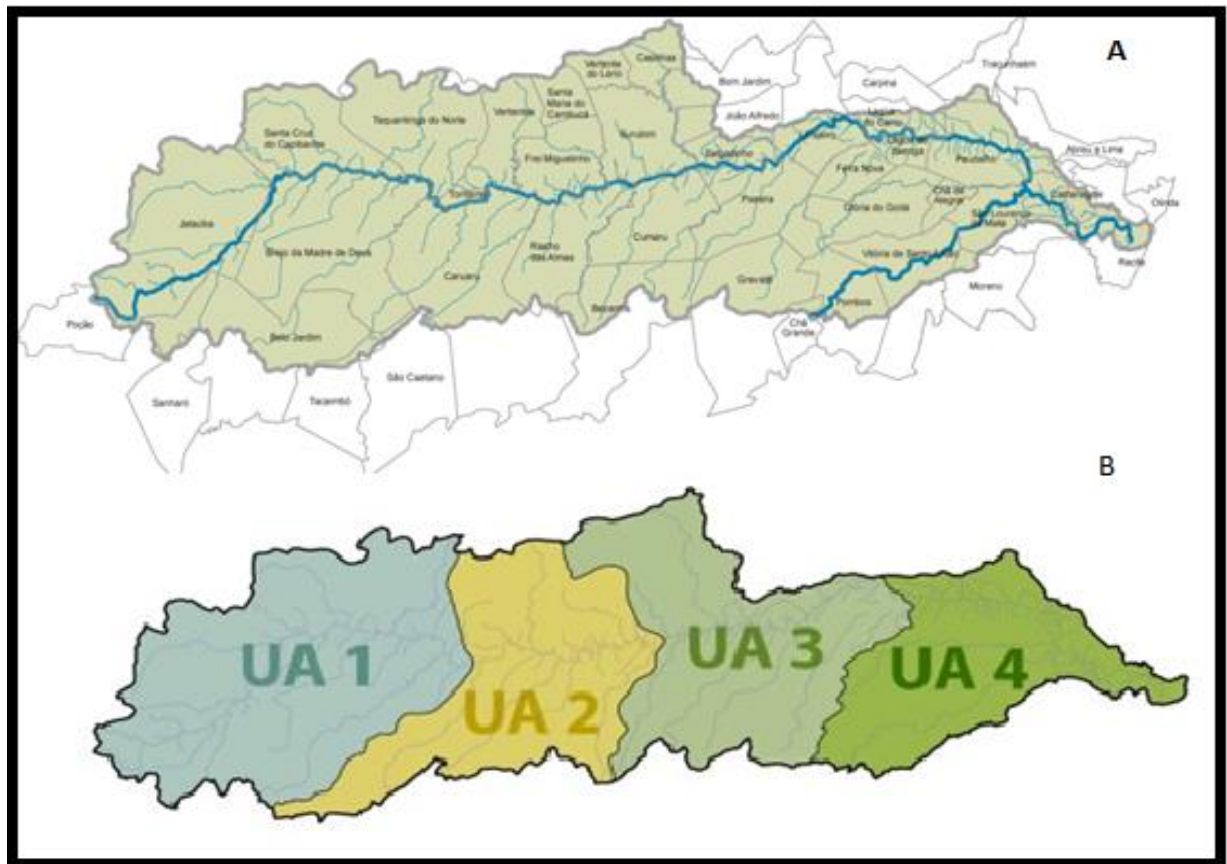
O rio Capibaribe, cartão-postal da capital pernambucana e que, há muito tempo, foi tido como fonte de saúde, é, hoje, o receptor de resíduos industriais, domésticos e hospitalares em consequência da deficiência na política de saneamento do estado.

Essa bacia tem uma área de 7.454,88 km², que corresponde a 7,58% da área total do Estado de Pernambuco, localizada entre as coordenadas 07° 41' 20" e 08° 19' 30" de latitude sul, e 34° 51' 00" e 36° 41' 58" de longitude oeste. Limita-se ao norte com a bacia hidrográfica do Rio Goiana e o Estado da Paraíba; ao sul com a Bacia Hidrográfica do Rio Ipojuca; a leste com o Oceano Atlântico e com as Bacias Hidrográficas secundárias dos Rios Beberibe, Botafogo, Pirapama, Jaboatão e Igarassu, que deságuam diretamente no mar; e a oeste, com a Bacia Hidrográfica do Rio Ipojuca.

Sua nascente ocorre a aproximadamente 195 km da cidade do Recife, capital do Estado, na Serra dos Campos no município de Jataúba e Poção, Agreste do Estado. Esse rio abastece 42 municípios do Agreste, Zona da Mata e Litoral e possui uma extensão total de 270km, da nascente até a sua foz, no Oceano Atlântico. Dos 42 municípios tem-se: Brejo da Madre de Deus, Chã da Alegria, Cumaru, Feira Nova, Frei Miguelinho, Glória do Goitá, Jataúba, Lagoa do Itaenga, Passira, Santa Cruz do Capibaribe, Santa Maria do Cambucá, Surubim, Toritama, Vertentes e Vertente do Lério totalmente inseridos na bacia. Os que possuem sede na bacia são: Camaragibe, Casinhas, Limoeiro, Paudalho, Pombos, Recife, Riacho das Almas, Salgadinho, São Lourenço da Mata, Taquaritinga do Norte e Vitória de Santo Antão. Os parcialmente inseridos na bacia são: Belo Jardim, Bezerros, Bom Jardim, Carpina, Caruaru, Chã Grande, Gravatá, João Alfredo, Lagoa do Carro, Moreno, Pesqueira, Poção, Sanharó, São Caetano, Tacaimbó e Tracunhaém (Figura 5A). Para o estudo do Plano Hidroambiental (PHA) do estado, a Bacia foi dividida em Unidades de Análise- UA, conforme mostra a Figura 5B.

Existe uma média aproximada de 3.474.198 habitantes que dependem do rio. No seu percurso, ele escoar por vários centros urbanos, onde serve para drenar os efluentes industriais, domésticos e hospitalares (PROÁGUA, 2002). Nos seus múltiplos usos o rio Capibaribe é percebido de variadas maneiras. As diferentes percepções e valores atribuídos a ele contribuem para a degradação das suas margens e poluição das suas águas (MEDEIROS, 2007; TEIXEIRA, 2007; NETO, 2008; CPRH, 2008).

Figura 5: Extensão do Rio Capibaribe da nascente até a sua foz (A) e suas Unidades de Análise - UA (B).



Fonte: http://www.sirh.srh.pe.gov.br/hidroambiental/img_capibaribe_municipios_01.html

Fonte: CPRH.

Analisando as unidades de análises, percebe-se que UA1 ou Unidade de Toritama abrange aproximadamente o terço superior da Bacia. Já a UA2 ou Unidade de Jucazinho envolve parte da Bacia que vai desde Toritama até a barragem de Jucazinho. A UA3 ou Unidade de Limoeiro compreende as áreas de drenagem do Capibaribe desde o açude Jucazinho até a barragem de Carpina e a UA4 ou Unidade de São Lourenço da Mata, abrange as áreas de drenagem do terço inferior da Bacia (CPRH, 2014).

Para caracterização climática da Bacia, o PHA considerou os dados das Normas Climatológicas do Brasil (1961-1990), do Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. Os dados observados foram extraídos do banco de dados agroclimático do Grupo de Agrometeorologia SDRN (FAO), por meio do programa FAOCLIM, que em território brasileiro contém dados de 1503 estações com precipitação mensal média e 798 mm com

evapotranspiração de referência previamente estimados pelo Método Penman-Montheith/FAO.

A bacia do rio Capibaribe é responsável pelo abastecimento de 14 cidades da Região do Agreste, inclusive a cidade de Caruaru e por 42% do abastecimento da Região Metropolitana do Recife. Essa bacia é dividida em três sub-bacias: Alto Capibaribe, a montante da barragem de Jucazinho, com área de drenagem de 4.172,00 Km², Médio Capibaribe, entre a barragem de Jucazinho e a barragem de Carpina com 1.982,00 Km² e Baixo Capibaribe, da barragem de Carpina até a sua foz com 1.398,27 Km² (CPRH, 2010).

De uma maneira geral, vale a pena considerar que as características ambientais marcadas por forte sazonalidade, chuvas concentradas e irregulares, as bacias hidrográficas do semiárido brasileiro são caracterizadas pela predominância de rios intermitentes e pela grande antropização com a construção de açudes e barragens. Estes ambientes lânticos possuem dinâmica particular quanto a interação do sedimento com a coluna d'água, além de possuírem inúmeras finalidades, como abastecimento, irrigação, lazer e pesca, sendo extremamente importante seu biomonitoramento (ESTEVEZ, 2011).

2.4.1 Características Gerais de Alguns Municípios Banhados Pelo Rio Capibaribe

2.4.1.1 Município de Toritama

O município de Toritama totaliza uma área de 25,704 Km² com uma população de 35.554 pessoas, localiza-se no Agreste setentrional de Pernambuco, a 167 km do Recife e a 36 km de Caruaru. Tem como principal atividade econômica Indústrias de Confecções e Lavanderias Industriais. Apesar de ser um município pequeno, é responsável por 14% da produção nacional de jeans no País (CPRH apud FADE/UFPE, 2003). Concentra-se uma média de 2.500 fábricas têxteis e, aproximadamente 70 lavanderias (CPRH, 2017). Cerca de 70% dos efluentes industriais e sanitários são descartados na rede pluvial (CPRH, 2005). Nesta localidade o rio apresenta alto nível de poluição por produtos químicos vindos das lavanderias. Esses dejetos têxtil são gerados nas etapas de lavagens, alvejamento, tingimento e acabamento das roupas em jeans com elevada carga poluidora, altos teores de compostos orgânicos, a exemplo de amido, gomas, graxas, pectinas, álcoois, ácido acético, corantes, sabões e detergentes e inorgânicos, como hidróxido de sódio, carbonatos, sulfetos e cloretos,

resultante das várias etapas do processo sendo, na maioria das vezes, bastante complexos (CPRH, 2017).

Segundo SANTOS (2006) os efluentes brutos das lavanderias apresentam altas variações de carga orgânica, dependendo da variação dos processos produtivos. O tratamento físico-químico implantado pelas lavanderias analisadas removeu apenas de 30% a 40% da carga orgânica, tendo apresentado elevada concentração de cálcio, alumínio e magnésio devido à adição de sulfato de alumínio e hidróxido de cálcio, usado para o tratamento físico-químico que, potencialmente, limita a utilização desse efluente para outros reusos (SANTOS, 2006).

2.4.1.2 Município de Santa Cruz do Capibaribe

Santa Cruz do Capibaribe tem uma população de aproximadamente 105.761 habitantes (IBGE, 2016). Este município está localizado a cerca de 185,7 quilômetros de distância da capital pernambucana, Recife é o 2º maior produtor de confecções do Brasil, ficando atrás apenas de São Paulo (SEBRAE, 2012). É responsável por 16% da produção de jeans no país (SEBRAE, 2012).

Um das principais atividades é a parte têxtil, a qual necessita de lavanderias de jeans, também chamadas de lavanderias industriais, necessitando de muita água em suas atividades e sendo uma grande potencial poluidor (BRITO, 2013).

2.4.1.3 Município de Surubim

Surubim é um município brasileiro do estado de Pernambuco, conhecido como a Capital da Vaquejada. Administrativamente, o município é formado pelos distritos sede e Chéus. Sua população, de acordo com estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2016, foi de 63.780 habitantes. Surubim está inserido nos domínios da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe e tem como principais tributários os rios Capibaribe e Caiai, além dos riachos do Brás, Maracajá, Pocoró, do Tanque Doce, Taepe e do Manso, todos de regime intermitente. Adicionalmente, o município apresenta também a barragem de abastecimento de Jucazinho. Tem uma grande atividade agrícola de base de irrigação e de piscicultura (IPEA, 2014).

A agricultura ao mesmo tempo que é geradora também é vítima da poluição das águas. Pois a utilização de águas contaminadas nas práticas de irrigação pode comprometer a lavoura, ocasionando problemas de saúde nas populações consumidoras. Os recursos hídricos agem como integradores dos processos biogeoquímicos de qualquer região. Assim, quando os agrotóxicos são introduzidos, os recursos hídricos, superficiais ou subterrâneos, são os principais destinos finais dessas moléculas (ÁGUA, 2007).

2.4.1.4 Município de Limoeiro

Limoeiro está localizado na Mesorregião do Agreste Pernambucano e na Microrregião do Médio Capibaribe e possui uma área de 277,54 km². A partir da cidade de Limoeiro, a cerca de 80 km da cidade do Recife, o rio Capibaribe entra numa região de transição entre o Agreste e a Zona da Mata, recebendo grandes contribuições de afluentes mais caudalosos e inicia a travessia de áreas cobertas por extensos canaviais. Até o início da colonização brasileira no século XVI, essa região era coberta pela densa Mata Atlântica, floresta que alimentava o rio com suas águas e protegia as suas margens com uma vegetação luxuriante. Ao longo dos séculos seguintes, a Mata cedeu cada vez mais espaço para as plantações, além de volumes substanciais de lenha para a produção da energia das caldeiras das usinas (para produzir 1 kg de açúcar era necessária a queima de 20 kg de lenha).

A calda das canas se transformava numa enorme variedade de produtos: o açúcar branco ou de purga, o cristal e o mascavo, além do melado de cana ou mel de engenho, diferentes tipos de rapadura e de aguardente, esta última uma importante moeda de troca nos tempos coloniais: os traficantes trocavam a aguardente e rolos de fumo, produzidos no Brasil, por escravos revendidos em inúmeros portos espalhados por toda a costa do continente africano.

A cultura da cana-de-açúcar deixou uma série de problemas para o rio Capibaribe:

- Sem a proteção da Mata Atlântica, os solos de massapê expostos às chuvas passaram a sofrer um forte processo de erosão, que carregou milhões de metros cúbicos de terra fértil para dentro da calha dos rios;
- O cultivo da cana exige o uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos – resíduos destes produtos acabam sendo arrastados pelas chuvas na direção dos rios, causando uma série de problemas para a flora e a fauna aquática;

– O processamento da cana para a produção do açúcar e do álcool liberam grandes volumes de resíduos – destaque para o vinhoto (cada litro de álcool produzido gera até 15 litros de vinhoto), que se despejado sem controle nas águas de um rio, pode provocar sérios problemas de poluição ambiental.

E o conjunto da obra de quase quinhentos anos de agressões ambientais, despejos de resíduos sólidos de todo o tipo, desmatamentos, assoreamentos e envenenamentos não poderia ser diferente de um rio impactado apresentando consequências para o ambiente e a sociedade.

2.4.1.5 Município de São Lourenço da Mata

São Lourenço da Mata é um município do estado de Pernambuco, localizado a 19,7 km da capital pernambucana, Recife. Com uma área: 264,3 km² e uma população média de 110 264 habitantes (IBGE/2015), este município encontra-se na mesorregião Metropolitana e na Microrregião Recife do Estado de Pernambuco, limitando-se a norte com o município de Paudalho, a sul com Jaboatão dos Guararapes e Moreno, a leste com Recife e Camaragibe e a oeste com Vitória de Santo Antão e Chã de Alegria. Na extensão do rio Capibaribe pelo município encontra-se cultura da cana-de-açúcar, pecuária, granjas e assentamentos rurais (CPRH, 2014). As atividades praticadas nessas áreas juntamente com os aglomerados rurais existentes nas mesmas geram resíduos que, lançados nos cursos d'água, constituem parte da carga poluidora destes, a qual é potenciada, nas áreas urbanas de São Lourenço da Mata, Camaragibe e Recife, por dejetos de origem doméstica e industrial e hospitalares (CPRH, 2014).

2.4.1.6 Município de Vitória de Santo Antão

O município de Vitória de Santo Antão encontra-se inserido nos domínios da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe. Seus principais tributários são: o Rio Capibaribe, Tapacurá, Tamatá Mirim, Jaboatão, Cueira de Suassuna e Ipojuca e, os riachos, são: Boeira, Várzea Grande, Açude Grande, Una, Natuba, Cgo. Laranjeiras e Guandu. O principal corpo de acumulação é a Barragem Tapacurá e os açudes: Toró e da Usina Santo Antônio. Os principais cursos de água no município têm regime de escoamento perenizado e o padrão de drenagem é o dendrítico (CPRH, 2005).

Vitória de Santo Antão integra a Mesorregião da Mata Pernambucana e à Microrregião de Vitória de Santo Antão, localizando-se a 50 quilômetros a oeste da capital. Sua área territorial é de 335,942 km², estando 5,717 km² em perímetro urbano (IBGE 2016). Em 2016, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimou sua população em aproximadamente 136.706 habitantes, sendo o décimo mais populoso município pernambucano, o quarto mais populoso do interior do estado e o mais populoso da Zona da Mata.

Utilizaz o rio tapacurá como local de liberação de resíduos das atividades econômicas desenvolvidas pelas cidades, seja através do comércio, das indústrias, das residências, hospitalares, agrícolas e agropecuárias (CPRH, 2016).

2.4.1.7 Município de Carpina

Carpina é um município da Zona da Mata Norte, no estado de Pernambuco, no Brasil. Dista 45 quilômetros da capital do estado, Recife. Segundo estimativa do IBGE em 2014 o município possuía uma população de 80.194 habitantes. Esse município está situado a uma latitude 07° 51' 03" sul e a uma longitude 35° 15' 17" oeste e possui uma área de 146,00 km². Sua taxa de urbanização é de 95,60%. Tem, como densidade demográfica, 516,51 habitantes por quilômetro quadrado. Este município encontra-se inserido nos domínios das bacias hidrográficas dos rios Goiana e Capibaribe. Seus principais tributários são os rios Tracunhaém, Capibaribe e Itapinassu além dos riachos: Bonito, das Bestas e Flores.

Os principais corpos de acumulação são os açudes Carpina (270 000 000 metros cúbicos) e Curtume. Os principais cursos d'água no município têm regime de escoamento perenizado e o padrão de drenagem é o dendrítico. Carpina tem como atividades: Usinas agroaçucareiras, centro hospitalar, atividades agrícolas e agropecuárias (CPRH, 2016). Essas atividades agregadas a liberação de resíduos domésticos causa grande problema saúde dos rios da região (IPEA, 2016).

2.4.1.8 Município de Recife

Capital Pernambucana, Recife representa uma área territorial de aproximadamente 218 km², é formado por uma planície aluvial, tendo as ilhas, penínsulas e manguezais como suas

principais características geográficas (IBGE 2000). Entre as cidades nordestinas, está como a melhor no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH-M). Com 4 milhões de habitantes em 2017 ocupa o lugar do quarto aglomerado urbano mais populoso do Brasil. Perdendo apenas para São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte (IBGE 2017).

De acordo com a divisão do IBGE vigente desde 2017, o município pertence às Regiões Geográficas Intermediária e Imediata do Recife. Até então, com a vigência das divisões em microrregiões e mesorregiões, o município fazia parte da microrregião do Recife, que por sua vez estava incluída na mesorregião Metropolitana do Recife.

O Recife é conhecido como "Veneza Brasileira" graças à semelhança fluvial com a cidade europeia de Veneza. Cercado por rios e cortado por pontes, é cheio de ilhas e mangues. Na cidade acontece o encontro dos rios Beberibe e Capibaribe que deságuam no Oceano Atlântico. O município conta com dezenas de pontes, entre elas a mais antiga da América Latina, a Ponte Maurício de Nassau.

Na vasta rede de rios e canais da metrópole pernambucana se destacam as bacias dos rios Capibaribe, Beberibe, Tejiptó e um sistema de drenagem composto por uma série de cursos d'água secundários ou canais, afluentes ou interligados à drenagem principal. Sua malha hídrica é composta por cursos d'água como os rios Moxotó, Jangadinha, Jiquiá e Jordão, além de diversos canais, e recebe ainda a contribuição do rio Capibaribe pelo seu "braço morto", e também de corpos d'água de expressão em áreas como a Lagoa do Araçá, o Açude da Várzea e o Açude Jangadinha.

2.4.1.9 Município de Recife, Riacho Cavouco

De representação Universitária e possuidor de uma extensão de aproximadamente 6000 metros da nascente até a foz com largura variável de 2m a 15m, o riacho Cavouco tem sua localização nas coordenadas 8°2'52.05" latitude Sul e 34°57'10.33" longitude Oeste (CALADO, et al., 2002). Esse riacho urbano tem seu percurso pelo Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e acaba sendo alvo de esgotos de natureza química, doméstica e hospitalar. Atravessa bairros urbanizados como Cidade Universitária e Iputinga e encontra-se com o riacho Caiara, deságuando na margem direita de um dos principais rios do estado de Pernambuco, o rio Capibaribe, que por sua vez deságua no oceano atlântico.

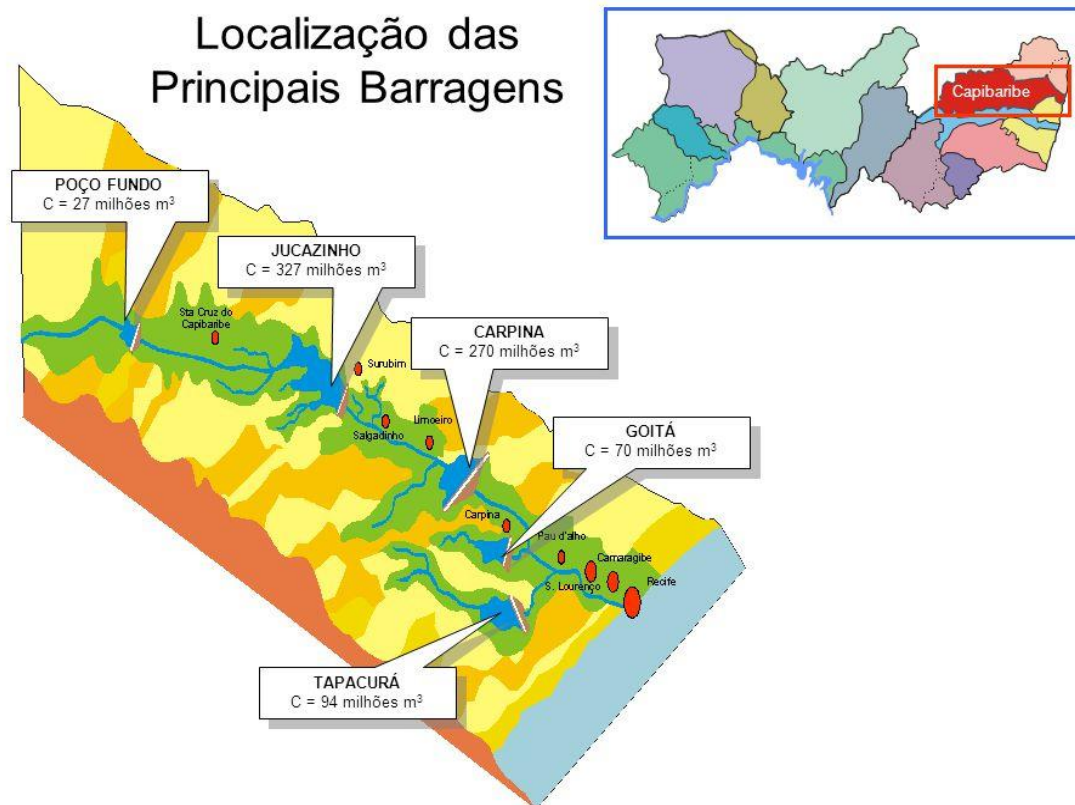
Tendo em vista a importância deste riacho no recurso hídrico, várias ações estão sendo realizadas com a finalidade de monitoramento, revitalização e conservação desse ecossistema. O Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, através do Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade - GEAQ, realizou, no período de 1998 a 2001, o monitoramento físico-químico da água desse riacho, avaliando principalmente a concentração de metais e a Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO e DBO). No trecho em que o Cavouco atravessa o Campus Recife da UFPE, foi constatado que houve redução da carga poluidora, nesse período, relacionando tal resultado ao planejamento estratégico conduzido pela UFPE, no sentido de minimizar a contribuição do lançamento dos esgotos do Campus nesse riacho (CALADO, et al., 2002).

Mesmo assim recentes evidências obtidas pelo Núcleo de Biossegurança e Meio Ambiente da UFPE (NuBIOMA) indicaram, por meio de análises físico-químicas da água e de biomarcadores enzimáticos, que o riacho ainda encontra-se impactado, com consequências ainda pouco conhecidas para as espécies que o habitam (ARAÚJO e OLIVEIRA, 2013; ASSIS et al., 2014).

2.4.2 Principais Barragens De Abastecimento Do Rio Capibaribe

Uma barragem, açude ou represa, é uma barreira artificial, feita em cursos de água para a retenção de grandes quantidades de água. A sua utilização é voltada para o abastecimento de água em áreas residenciais, agrícolas, industriais, produção de energia elétrica (energia hidráulica), dentre outras. A Figura 6 demonstra as principais barragens do rio Capibaribe.

Figura 6. Localização das principais Barragens do Rio Capibaribe



Fonte: https://images.slideplayer.com.br/16/4920623/slides/slide_37.jpg

2.4.2.1 Barragem de Tapacurá

A bacia hidrográfica é o elemento fundamental de análise do ciclo hidrológico, principalmente na sua fase terrestre que engloba a infiltração e o escoamento superficial. Ela é uma área de captação natural da água da precipitação que faz convergir os escoamentos para um único ponto de saída, seu exutório (TUCCI 1993). Sua estrutura se dá por um conjunto de superfícies vertentes e de uma rede de drenagem formada por cursos de água que confluem até resultar um leito único no exutório. A bacia é como um sistema físico onde a entrada é o volume de água precipitado e a saída é o volume de água escoado pelo seu exutório, levando em consideração, como perdas intermediárias, os volumes evaporados e transpirados e também os infiltrados profundamente (TUCCI 1993).

Tendo sua nascente na região Agreste do Estado de Pernambuco, na Serra das Russas, o rio Tapacurá que muitas vezes recebe o nome de Boeiro, passa por três importantes

municípios; Pombos, Vitória de Santo Antão e Chã Grande, e por fim é represado na barragem de Tapacurá. Sua extensão é de aproximadamente 30 km e uma área de 360 km². A disponibilidade hídrica da Bacia é estimada em 2,10 m³.s⁻¹, correspondendo a 9,48 % da disponibilidade total dos mananciais que abastecem a Região Metropolitana do Recife.

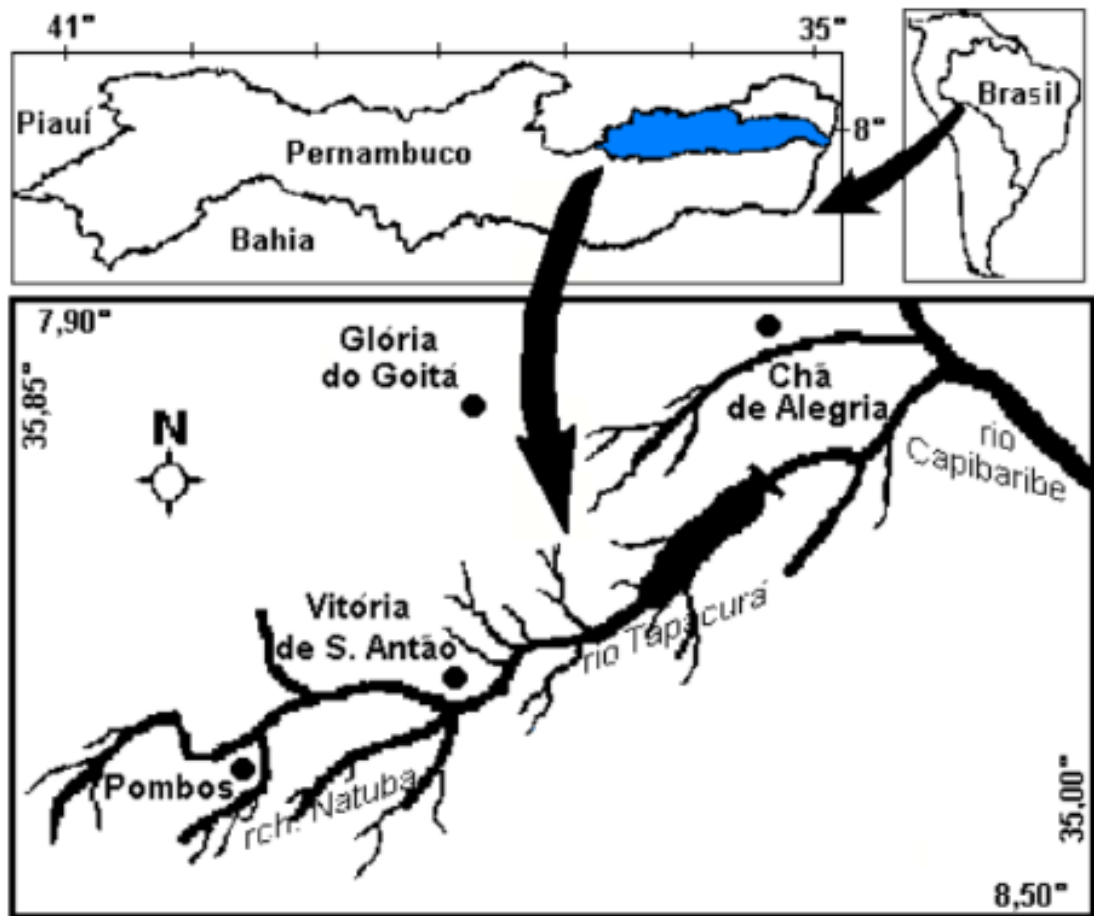
A bacia hidrográfica do rio Tapacurá é formada com doze sub-bacias sendo as principais formadas pelos riachos Itapessirica, Natuba, Gameleira e Várzea do Una e abrange seis municípios, sendo que 38,6% localizam-se em Vitória de Santo Antão, 31,2% em Pombos, 19,8% em São Lourenço da Mata, 4,3% em Gravatá, 3,3% em Moreno e 2,8% em Chã Grande (CPRH, 2015).

A barragem de Tapacurá teve sua construção iniciada em 1977, com o objetivo de proteção das cheias. Em 1987 o coroamento foi aumentado de 3 m de altura, e hoje o reservatório possui uma capacidade de acumulação de 94.200.000m³ (APAC, 2014).

A área de drenagem é de 470,5 km². O trecho superior do rio começa no município de Gravatá (390 m em relação ao nível do mar), o curso médio termina alcançando o reservatório de Tapacurá. A jusante da barragem, o rio Tapacurá deságua no rio Capibaribe no município de São Lourenço da Mata, do qual é o principal afluente.

Limita-se ao norte com as bacias dos rios Goitá e Cotunguba (ambos afluentes do Capibaribe), a oeste com a bacia do Cotunguba, ao sul com as bacias dos rios Ipojuca, Pirapama e Jaboatão, e a leste com as dos rios Jaboatão e Muribara, este último, também afluente do Capibaribe.

Figura 7- Bacia hidrográfica do rio Tapacurá



https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Mapa-da-bacia-do-Rio-Tapacura-com-a-localizacao-dos-municipios-inspecionados_fig1_309034234

2.4.2.2 Barragem de Jucazinho

A Barragem Jucazinho é o maior reservatório para abastecimento humano do Agreste, tem capacidade para armazenar mais de 327 milhões de metros cúbicos de água (Figura 8A-C). De acordo com a Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC, 2018). O manancial registra atualmente 2,58% do seu nível de acumulação, volume que corresponde a 8,4 milhões de metros cúbicos de água e é responsável pelo atendimento de 15 municípios do Agreste, dentre eles, Surubim, Cumaru e Passira (APAC, 2018).

Esta barragem corresponde a aproximadamente 4.171 km² inserida no Agreste Pernambucano, conforme mostra a Figura 8 A. Sua área de contribuição está compreendida nas UA1 e UA2, conforme mostra a Figura 8B.

Figura 8. Área de distribuição hídrico ao reservatório de Jucazinho (A), Unidades de Analises (B), Barragem de Jucazinho (C)

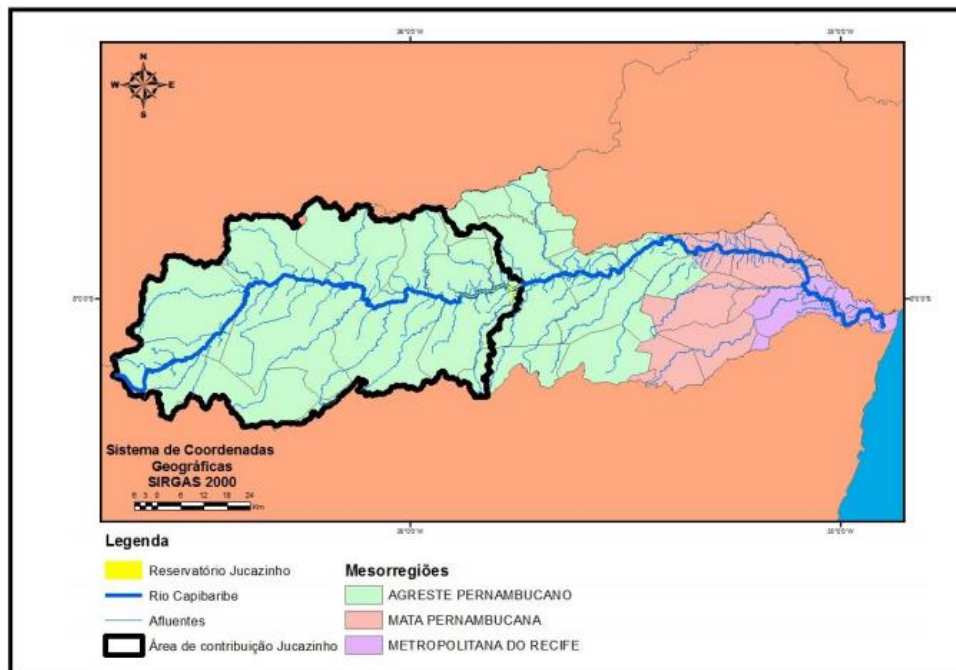


Figura 8 (A)

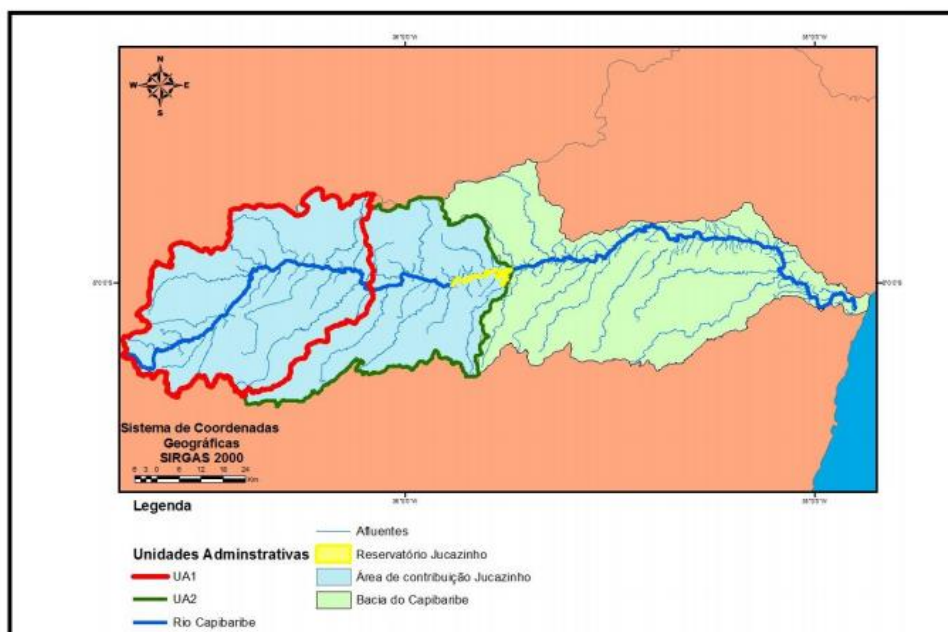


Figura 8 (B)



Figura 8 (C)

Fonte: Barbosa, 2011.

A área de contribuição ao reservatório Jucazinho está completamente inserida na região do Semiárido Nordeste. Por esse motivo a região caracteriza-se por chuvas irregulares e concentradas em curto período do ano e elevadas taxas de evaporação, fazendo com que o regime de vazões no rio Capibaribe até o reservatório Jucazinho seja intermitente.

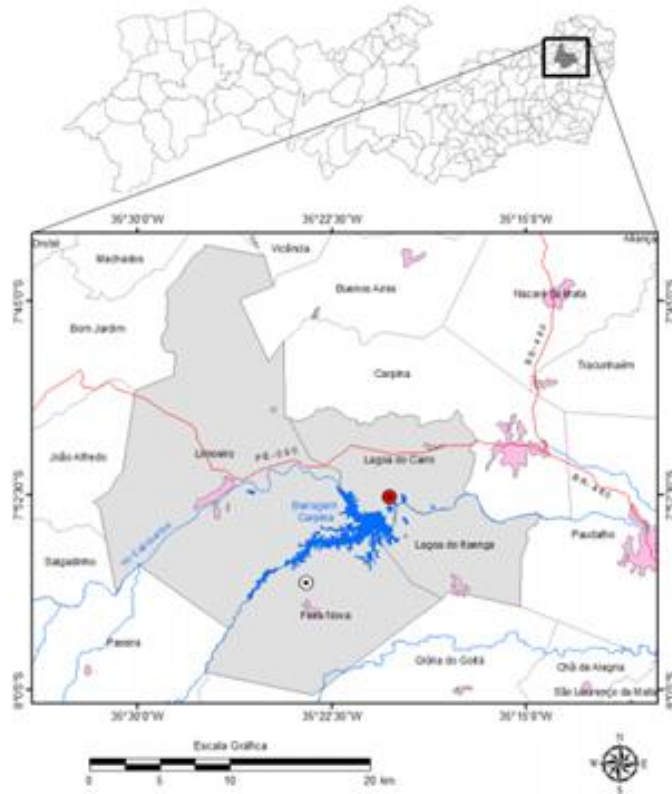
A precipitações médias anuais baixas, associadas e altas temperaturas produzem vazões específicas baixas. Além disso, os cursos d'água no cristalino, como é o caso desta região, não têm suporte de vazão de base nem de superfície o ano todo para se manterem perenes (PLANO HIDROAMBIENTAL DA BACIA DO RIO CAPIBARIB, 2010). Sua importância é facilmente visível. Existe registros de atividades de lazer e recreação, turismo e pesca.

2.4.2.3 Barragem de Carpina

Localizada no Município de Lagoa do Carro, porém sua área de alimentação abrange parte dos municípios de Lagoa do Carro, Lagoa de Itaenga, Feira Nova e Limoeiro, a

Barragem de Carpina foi construída com a finalidade de contenção de enchentes. Atualmente ela também é responsável pelo abastecimento público e para pesca da região (Figura 9).

Figura 9: Mapa da localização da Barragem de Carpina



Fonte: IBGE, Malhas digitais, 2010; EMBRAPA SOLOS. ZAPE Digital, 2001

O Rio Cotunguba representa o principal afluente do rio Capibaribe na bacia de contribuição do reservatório de Carpina. Ele é constituído pelos seguintes afluentes: riacho Ribeiro, riacho Cachoeira e riacho Lagoa da Vaca. A maior concentração populacional da bacia de alimentação do reservatório de Carpina está no Município de Limoeiro, com cerca de 49% do total da população da área de alimentação.

Embora Lagoa de Itaenga seja o segundo município em população absoluta, é o que se destaca por ter maior taxa de urbanização (83%) em oposição à zona rural que possui apenas cerca de 17% do total da população (IBGE, 2010). Em termos de urbanização, Limoeiro vem logo atrás com 80% da população na área urbana, Feira Nova fica em terceiro lugar com 79% da população no centro urbano e, por último, apresentando menor taxa de urbanização, vem o Município de Lagoa do Carro com 73% de população urbana (IBGE, 2010).

2.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *Oreochromis niloticus*

Os ciclídeos são de família de peixes dulcícolas, bastante avançados dentre os perciformes. Compreendem mais de mil espécies nativas da América do Sul e Central, parte da África, Sul da Índia, Madagascar, Sri Lanka, Síria e as Índias Orientais (BERRA, 2001).

Apresentam alta tolerância a variação de salinidade e qualidade da água. Algumas espécies de Cichlideos toleram água doce, salobra e marinha, característica atribuída à distribuição zoogeográfica dessa família. Seus registros fósseis datam do Eoceno e Oligoceno na África e na América do Sul (WOODWAR, 1939; VA COUVERING, 1982). Ciclídeos de interesse experimental ou comercial para a alimentação são os do gêneros: Tilápia spp., *Oreochromis* spp. e *Sarotherodon* spp.

As espécies que compõe esse três grupos possuem uma taxonomia recente, com aproximadamente 20 anos de classificação. O gênero *Oreochromis* tem se mostrado de maior interesse para os produtores, com a espécie tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em primeiro lugar na produção brasileira (RICARTE et al., 2014; IBGE 2013).

A Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* pertence a família Cichlidae, da ordem dos Perciformes. A família dos Ciclídeos é composta por mais de 1900 espécies distribuídas mundialmente, incluindo a América do Sul onde existem aproximadamente 291 espécies descritas (KULLANDER, 2003).

A espécie foi introduzida em outros continentes, incluindo na América do Sul, por volta da metade do séc XX (entre 1940 e 1950) e sua disseminação se estendeu por todo o continente americano. No Brasil, sua introdução ocorreu por volta de 1971, quando espécimes advindos da Costa do Marfim foram trazidos com o objetivo de incrementar a produção aquícola nacional (KULLANDER, 2003).

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, se destaca de outras espécies por conseguir viver em habitats variados, tais como: grandes rios equatoriais, tropicais e subtropicais, rios com corredeiras, áreas pantanosas, lagos profundos, águas salinas e alcalinas e lagos artificiais (EL-SAYED, 2006).

Existe variações em seu período de maturação sexual, variando de 5 e 12 meses, devido aos fatores ambientais. Habitam em grandes lagos e exibem maturação sexual mais tardia e com um maior peso corporal comparado com espécimes presentes em pequenas lagoas (EL-SAYED, 2006).

Sua alimentação é predominantemente herbívoro-omnívora e apresenta baixa seletividade alimentar. Apresentando preferência por fitoplâncton, perifiton e detritos de origem vegetal. Na sua fase larval, porém apresenta preferência por zooplâncton (crustáceos), e nas fases juvenil e adulta ocorre a transição para hábitos fitófagos (TUCH, 1999; EL-SAYED, 2006).

Devido à grande variação de habitats em que as tilápias são encontradas, as espécies apresentam grande tolerância às alterações ambientais da água. (FAO, 2010). Mesmo apresentando uma variação nos habitats, as tilápias do Nilo mantêm seu território próximo ao local de nascimento (Tuch, 1999) e pode chegar até 2.000 m² (EL-SAYED, 2006).

Apresentam uma tolerantes a baixa concentração de oxigênio dissolvido, podendo chegar até até 0,1 mg/L. (FAO, 2010).

A temperatura ideal para o crescimento e atividade reprodutiva para as espécies do gênero *Oreochromis* varia entre 22° C e 29° C. Apresentando uma grande aceitação a variações de temperatura. Tendo temperatura letal inferior de 10°C ou superior de 42°C (FAO, 2010).

É bastante tolerante ao pH da água, podendo tolerar de pH 3,7 até pH 11, e a faixa ótima de pH para a maior parte das espécies se situa entre 6 e 9. Outro parâmetro importante para a sobrevivência das espécies de *Oreochromis* é a concentração de amônia presente na água, cuja concentração ótima se encontra abaixo de 0,05 mg/L (FAO, 2010).

A espécie *O. niloticus* apresenta grande tolerância às variações ambientais como temperatura da água, salinidade, pH, pO₂, e a outros fatores causadores de estresse agudo e/ou crônico para a maioria dos peixes (EL-SAYED, 2006).

No início da década de 1970 foi introduzido tilápia do Nilo, atualmente ocupa o principal lugar das espécies de peixes produzida no Brasil (IPEA, 2017). Foi introduzida, juntamente com a tilápia de Zanzibar *O. hornorum*, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Os primeiros espécimes foram introduzidos pelo DNOCS com o intuito de proporcionar a produção de alevinos para o peixamento dos reservatórios públicos da região Nordeste e para o fomento do cultivo (IPEA, 2017).

Na década de 1980, principalmente a partir das estações de piscicultura das companhias hidrelétricas de São Paulo e Minas Gerais, foram produzidas grandes quantidades de alevinos para repovoamentos e venda a produtores rurais (KUBITZA, 2003).

Rapidamente, a espécie foi introduzida em diversos corpos hídricos e propriedades do Nordeste e do Sudeste, e mais tarde ampliada à região Sul. Ainda nessa década, a tilapicultura

passou de uma atividade voltada para o repovoamento e complemento de renda a pequenos produtores para uma atividade explorada comercialmente, com o surgimento dos empreendimentos pioneiros (FIGUEIREDO JÚNIOR e VALENTE JÚNIOR, 2008).

A tilápia um ótimo perfil para a piscicultura, com índices zootécnicos interessantes para a sustentabilidade da produção. Por ser uma espécie originária de clima tropical, sua faixa de temperatura em torno de 26 °C-28 °C possibilitou a expansão da cultura para muitas regiões do país (SEBRAE, 2014).

O ciclo produtivo da tilápia no Brasil tem variado bastante de acordo com a região. Um dos principais pontos na produção, o clima, tem influenciado o metabolismo dos animais, fazendo com que as produções em estados mais quentes, como no Nordeste, tenham vantagens em relação aos estados mais frios, como no Sul do país.

O cultivo de tilápia é o mais importante dentre os cultivos aquícolas do Brasil em termos de volume produzido e no aspecto socioeconômico (EMBRAPA, 2014). As tilápias do gênero *Oreochromis* corresponde a 43,1% da produção nacional de peixes, seguido pelo tambaqui (22,6%) e pelo grupo tambacu e tambatinga (15,4%) IBGE (2013); (MPA, 2012; LOBO, 2014).

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1

Monitoramento do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil, por análise genotóxica e mutagênica em *Oreochromis niloticus* e aspectos físicos e químicos da água

Este artigo será submetido à revista

Aquatic Toxicology

Qualis: A2

ISSN: 0166-445X

Fator de Impacto: 4.18

Corresponding author:

Maria Betânia Melo de Oliveira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540 Recife, PE, Brasil;

E-mail address: maria.bmoliveira@ufpe.br

Monitoramento do Rio Capibaribe, Pernambuco, Brasil, por análise genotóxica e mutagênica em *Oreochromis niloticus* e aspectos físicos e químicos da água

Jordany Gomes da Silva^{1,3}; Cristiano Chagas³; Ranilson de Souza Bezerra¹; Maria Betânia Melo de Oliveira².

¹Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Laboratório de Biologia Molecular – BioMol, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

³Laboratório de Biotecnologia e Fármaco vinculado ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos estão, cada vez mais, sofrendo ações antrópicas que causam danos para os organismos que ali habitam. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade das águas do rio Capibaribe por meio de variáveis físico-químicas e verificar a ação genotóxica e mutagênica dos compostos xenobióticos em populações de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao longo de um gradiente de contaminação. Foram coletados água e espécimes (15) de Tilapia nos seguintes municípios: Santa Cruz do Capibaribe (SAC), Toritama (TOR), Surubim (SUR), Limoeiro (LIM), São Lourenço (SAL), Cavouco (CAV) e Recife (REC) durante os anos de 2015, 2016 e 2017. Para análise da água foram investigados os seguintes parâmetros: Temperatura (°C), Turbidez (NTU), Condutividade (µS/cm), Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L), pH, Oxigênio Dissolvido (mg/L) e Metais pesados (sete). Adicionalmente, foram realizadas análises genotóxicas e mutagênicas por meio de Ensaio Cometa e Testes de Micronúcleo (MN), além dos índices pluviométricos mensais disponibilizados pela Agência Pernambucana de Águas e Climas – APAC. Os resultados mostram que as águas do rio Capibaribe apresentam uma carga de poluição significativa com diferentes níveis de contaminação, sendo o ponto SAC e TOR os mais impactados. Em

relação aos testes de genotoxicidade e mutagenicidade foram identificados altos índices de danificação genômica (micro e macrolesões no DNA) em todos os períodos e pontos investigados ($p < 0,05$) com destaque, novamente, para SAC e TOR, confirmando os dados de análises físico-químicos. Os resultados aqui apresentados demonstram o impacto ambiental sofrido neste ambiente como resultado do descarte inadequado de resíduos provenientes da indústria têxtil, esgotos dos centros urbanos e da agricultura local dificultando a qualidade da água e manutenção de vida aquática, bem como a relação do índice de dano com a pluviosidade local.

Palavras - Chave: Biomarcador; Monitoramento Ambiental; Testes de Genotoxicidade; Atividade Enzimática.

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos sofrem vários efeitos ambientais pela ação antrópica, o que vem sendo intensificado com o aumento da urbanização e do processo de industrialização. Estes ecossistemas acabam sendo o depósito final da maioria dos poluentes, seja pelo lançamento direto ou indireto de resíduos comprometendo sua biodiversidade. Devido à grande importância dos recursos hídricos, a qualidade da água é algo indispensável, pois é fato que muitos mares, rios, lagos e outras fontes de recursos hídricos encontram-se em processo de degradação, com altos índices de substâncias orgânicas e inorgânicas prejudiciais à saúde humana e ao equilíbrio ecológico (Hering et al., 2015; Lorente et al., 2015).

Essa poluição pode ser devido a vários fatores, como: despejo de esgotos industriais, esgotos domésticos e agrotóxicos provenientes da agricultura, produtos químicos oriundos de atividades de ensino e pesquisa, dentre outros. Muitos destes compostos são tóxicos e apresentam habilidade de interagir com o material genético, causando danos ao DNA, sendo considerados, portanto, agentes citotóxicos, genotóxicos e/ou mutagênicos (Akinboro et al. 2011).

O rio Capibaribe é um dos principais patrimônios hídricos do Estado de Pernambuco. Ele nasce aproximadamente a 195 km da cidade do Recife. Nesse percurso escoar por vários centros urbanos, os quais utilizam o rio irregularmente para drenar os efluentes industriais, domésticos e hospitalares (FERNANDES et al., 1999).

Vários são os métodos utilizados para monitorar ambientes aquáticos impactados. Dentre estes, destacam-se as análises físico-química da água, como uma das análises preliminares em programas de monitoramento aquático e a utilização de métodos adicionais como o Ensaio Cometa e Testes de Micronúcleo (MN), amplamente utilizados como biomarcadores de danos genéticos (OSMAN, 2014).

Os peixes são frequentemente utilizados como organismos e/ou indicadores em programas de monitoramento por sofrerem bioacumulação e responderem a agentes mutagênicos em baixas concentrações (ASSIS et al., 2014). A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe que possui elevada sensibilidade a alterações ambientais e por isso é frequentemente utilizada como espécie sentinela para indicar o potencial de exposição de uma população a substâncias genotóxicas, citotóxicas e mutagênicas presentes na água (VICENTE e FONSECA, 2013; MATSUMOTO et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade das águas do Rio Capibaribe, utilizando teste mutagênicos em Tilápia do Nilo *O. niloticus* como bioindicador e variáveis físico-químicas das águas.

METODOLOGIA

Foram escolhidos para as coletas trechos do rio Capibaribe que tinham grande interação com o município. Santa Cruz do Capibaribe e Toritama pela sua relação com a parte têxtil, Surubim pela grande representação em irrigação e piscicultura, Limoeiro e São Lourenço por serem cidades da zona urbana que acompanha o rio, Carpina pela grande representação agropecuária e Recife pela interferência urbana da zona metropolitana sobre este ambiente. As coletas foram realizadas nas estações secas e chuvosas dos três anos (2015, 2016 e 2017). Para utilização de controle positivo e controle negativo, foi disponibilizado espécimes de tilápias juvenis dos tanque de controle do departamento de piscicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, no qual foi adicionado 0,3ml de ciclofosfamida para obtenção do controle positivo. O manuseio com os peixes nos locais de coleta e nos laboratórios foi autorizado por meio do protocolo 004.533/2015 cedido pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da comissão de ética animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para a coleta do tecido sanguíneo, o animal foi retirado da água e imediatamente envolvido em um pano de algodão umedecido com água. Logo após, foi feita uma secção da veia caudal para coleta do sangue com auxílio de seringas de insulina previamente heparinizadas para realização dos ensaios genotóxicos. Em seguida foram realizados os procedimentos do ensaio cometa, conforme protocolo de Ostling e Johanson (1984), modificado em 1988 por Singh et al. e revisado por Tice et al. (2000), além do teste de micronúcleo proposto por Schmid (1975).

Área de Estudo e Coleta da água

O rio Capibaribe fica localizado nas coordenadas: 7°54'8"19 S e 34° 54'36"42'O e cobre uma área de superfície de 7716 km² do nordeste do Brasil. Este estudo investigou sete pontos de amostragem, denominados: TOR (Toritama 8°00'47.9"S 36°03'43.9"W), SAC (Santa Cruz do Capibaribe 7°57'29.5"S 36°11'50.1"W), SUB (Surubim 7°57'55.3"S

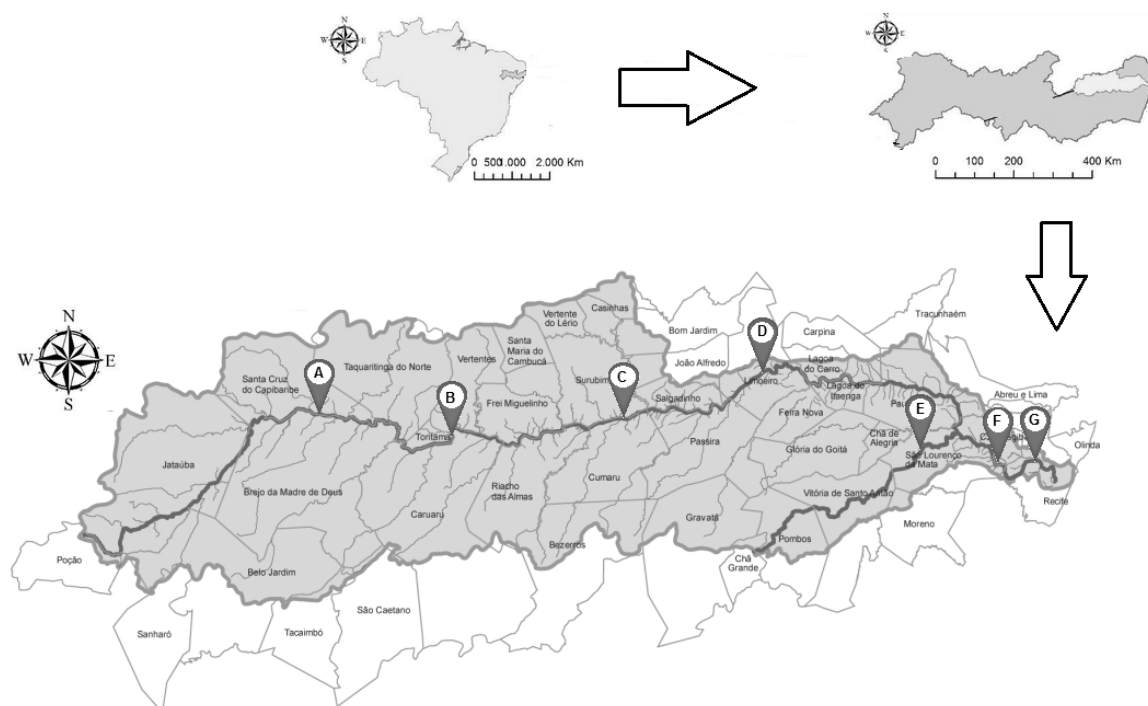
35°44'34.0"W), LIM (Limoeiro 7°52'01.6"S 35°25'32.0"W), SAL (São Lourenço da Mata 7°59'11.1"S 35°03'40.3"W), REC (Recife 8°03'54.0"S 34°54'03.0"W) e CAV (Riacho Cavouco-UFPE 8°02'52.4"S 34°57'09.0"W), ver Figura 1. Esses pontos foram escolhidos devido às características de interação desses municípios com o rio. Foram realizadas seis coletas em cada ponto (três em períodos chuvosos – alta pluviosidade e três em períodos de estiagem – baixa pluviosidade). Essas coletas aconteceram na mesma época durante três anos sempre no período matinal (2015, 2016 e 2017).

A coleta da água foi realizada em uma profundidade média de aproximadamente 30 cm da superfície do espelho d'água. Após a coleta as amostras foram armazenadas em garrafas de polietileno tereftalato (PET- 2L) e encaminhadas para o Laboratório de Análises Minerais, Solos e Água (LAMSA) da UFPE.

Nesse estudo foram determinados analiticamente nove parâmetros físico-químicos, como: Temperatura (°C), Turbidez (NTU), Condutividade (µS/cm), Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L), pH, Oxigênio Dissolvido (mg/L) da água por meio de um aparelho multiparâmetro. Adicionalmente foram determinados os seguintes metais: Ferro (Fe), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cromo (Cr) e Cádmio (Cd), mediante espectrofotometria de absorção atômica (aparelho CG AA 7000). Após as análises foi feito um estudo comparativo, correlacionando os resultados laboratoriais obtidos aos limites máximos estabelecidos para os corpos hídricos classe II pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, nº 357 de 17 de Março de 2005.

Para análise de genotoxicidade e mutagenicidade foram coletados 15 indivíduos da espécie *O. niloticus*, transportados para o laboratório de Biotecnologia de UFPE/CAV.

Figura 1: Mapa de localização dos pontos de monitoramento (coleta) do trecho estudado no Rio Capibaribe no estado de Pernambuco (A- Santa Cruz do Capibaribe, B- Toritama, C- Surubim, D- Limoeiro, E- São Lourenço da Mata, F- Cavouco e G- Recife).



Ensaio de Genotoxicidade e Mutagenicidade

O ensaio cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Singh et al. (1988) com adaptações. Amostras de sangue de *O. niloticus* foram obtidas através de punção caudal, utilizando seringas contendo anticoagulante (heparina). Para esse teste é preciso que todo procedimento após a coleta do material seja feito em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca), pois o experimento é fotossensível. Primeiramente, 15 μL do sangue coletado foram homogeneizados com 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão, e tal mistura foi depositada em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para o refrigerador (temperatura de 4 °C) por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram depositadas em cubas (sempre protegidas da luz) com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após 48 horas na lise, as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de ± 300 mA e diferença de potencial de 32V. As lâminas que serviram de controle positivo foram expostas durante 10 minutos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 200 mM, diluído no tampão de eletroforese entre as etapas de lise e eletroforese. Depois

deste tempo, o tampão de eletroforese foi trocado por um novo e seguiu-se o protocolo convencional do ensaio cometa. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para revelação, cada lâmina foi corada com 30 µL de solução de brometo de etídio (0, 0002%, p/v). A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Foram analisados 100 nucleóides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleóide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor dá-se o nome de índice de dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado da seguinte forma:

$$\text{ID total} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe } 0) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe } 1) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe } 2) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe } 3) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe } 4)$$

Outro parâmetro analisado foi a frequência de danos (FD%), calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleóides com algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleóides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS et al., 2008). Seguindo a fórmula:

$$\text{FD} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe } 0) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

Teste de Micronúcleo (MN)

Cinco microlitros do sangue coletado de cada animal foram depositados em lâmina com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material biológico. As lâminas passaram por uma preparação prévia para receber o material biológico. Inicialmente, foram lavadas com detergente neutro e água destilada, depois foram banhadas em álcool 70% e depositadas em estufa (80 °C) por 15 minutos. Ainda aquecidas, espalhou-se uniformemente 10 µL de laranja de acridina (1 mg/mL) em cada lâmina e posteriormente colocadas para secar em temperatura ambiente (mínimo 30 minutos) (EIJI et al., 1992). Para os ensaios de MN foram utilizados 4000 células dos indivíduo para se

quantificar a presença de células micronucleados (OCDE, 2014). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488.

Analise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software R (R Core Team, 2015) e IBM SPSS Statistics versão 20. Medidas descritivas das principais variáveis do estudo foram analisadas e seu comportamento foi observado através do boxplots dos dados. As análises foram realizadas de acordo com a mediana, pois os valores apresentados eram assimétricos não sendo representados pela média.

Para o teste cometa foram utilizados dois parâmetros distintos: O índice de dano (ID), calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o número referente ao nível de dano e, a frequência do dano (FD); calculada como a porcentagem de todos os cometas em relação ao número total de células avaliadas. Para tanto, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para k amostras independentes, quando a variância não foi homogênea ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSAO

O crescimento urbano e o processo de industrialização inconsequente gera diversos problemas ambientais. A importância dos rios pode ser percebida em toda a história da humanidade. A relação entre os homens e os rios está agregada a alimentação, moradia, transporte, consumo de água, agricultura, pesca, comercio entre outras atividades. O intenso aumento das atividades antrópicas intensificou a pressão sobre os recursos naturais causando assim passivos ambientais. Seja ela nas regiões urbanas ou rurais. Estas informações podem ser confirmadas de acordo com os resultados aqui apresentados. Todos locais de coletas apresentaram grupos com frequência de micronúcleos (teste de micronúcleo) e índice de dano ao DNA (teste cometa) maior do que o controle negativo, ou seja o valor de $p < 0,05$, revelando que todos os pontos investigados no presente trabalho apresentam grau de poluição preocupante, uma vez que existem varias atividades industrias nos diferentes pontos. Essas atividades de poluição se intensifica quando chove, pois a região passa por um fenômeno

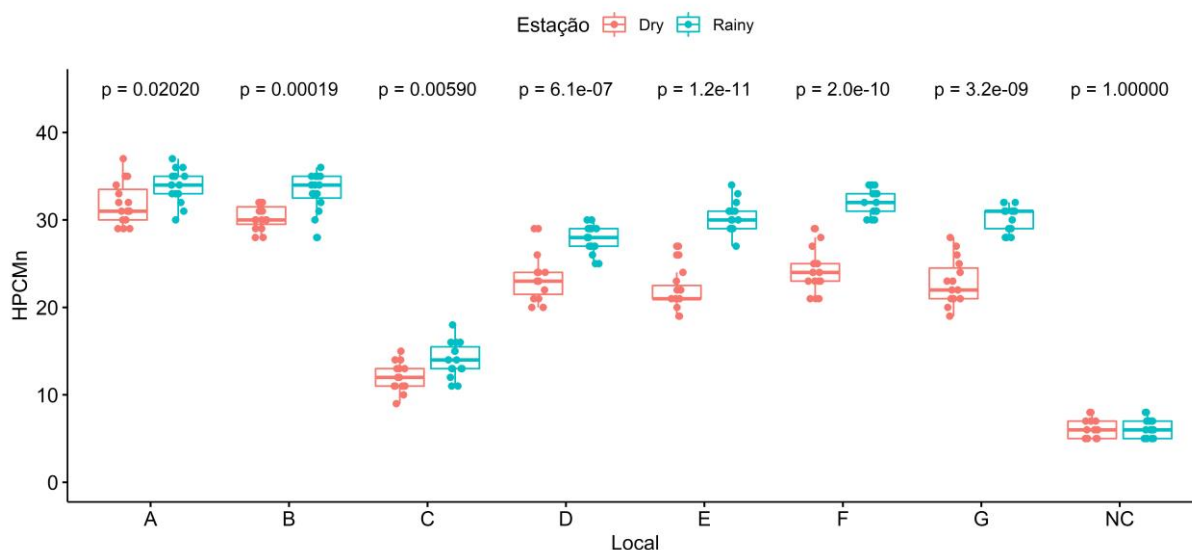
chamado de escoamento superficial e lixiviação. Ademais, existe a interferência dos esgotos domésticos e hospitalares, contribuindo com uma elevada concentração de resíduos.

Os dados revelaram que no ano de 2015 existiu uma diferença estatística entre as estações seca e chuvosa, onde nas estações chuvosas foram detectados os maiores danos (Gráfico 01). Este resultado pode ser explicado pelo processo de escoamento superficial e lixiviação. Os escoamentos da água na superfície são responsáveis pelo transporte de espécies químicas para os mananciais superficiais e subterrâneos, os podem ter suas características físicas, químicas e biológicas alteradas, geralmente, comprometendo a qualidade requerida para alguns usos (CARVALHO et al., 2000).

O local que mais se aproximou do controle negativo foi o município de Surubim, isso se dá pelo sua baixa inserção na zona Urbana. Algo que aparece de forma contrária para Santa Cruz do Capibaribe e Toritama. Pois são locais com forte influência Urbana além de toda interferência das indústrias têxtil. Esses resíduos se caracterizam por apresentar alta carga de compostos químicos orgânicos. Os corantes são os principais resíduos desses efluentes, sendo estes compostos de difícil degradação e altamente tóxicos para o meio ambiente. O descarte dos efluentes têxteis sem tratamento nos ambientes aquáticos tende a diminuir o oxigênio dissolvido, os corantes impede a entrada da luz solar nas camadas mais profundas, alterando a atividade fotossintética do meio, prejudicando a qualidade dessa água e resultando em efeitos tóxicos sobre a fauna e flora aquática (KRISHNASWAMY, 2016).

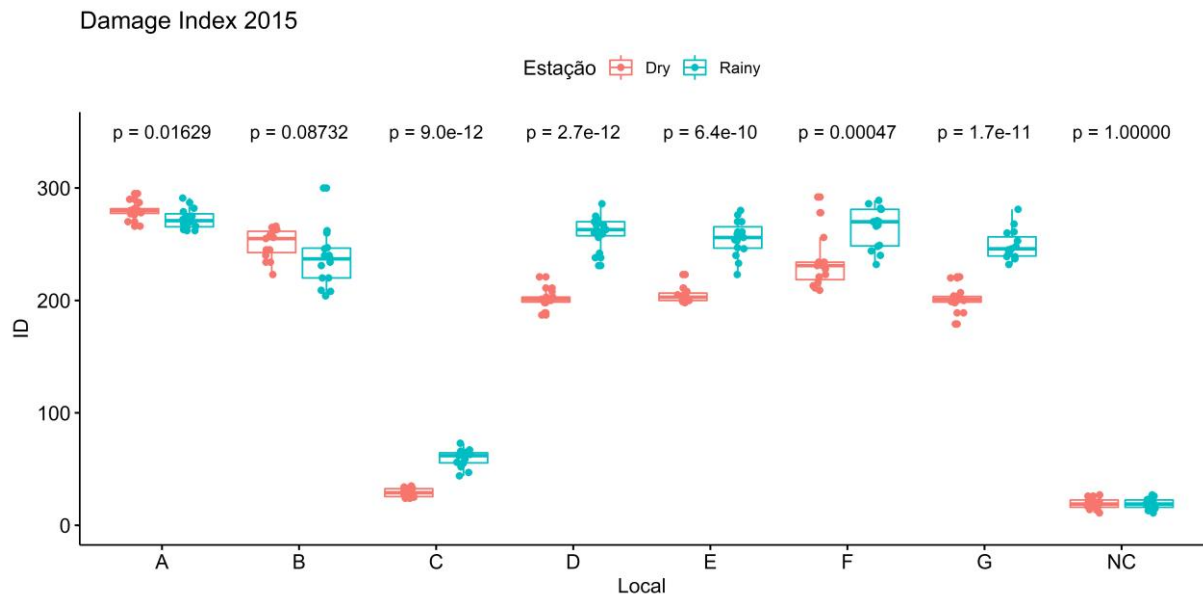
Gráfico 01 - Boxplot do das células micronucleadas (HPCMn) das estações chuvosa e seca de espécimes de *O. niloticus* nos sete pontos de coletas no ano de 2015 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo).

Micronucleus Test 2015



O teste de micronúcleos detecta quebras ao longo da fita do DNA com perda cromossômica, detectando danos irreparáveis no DNA. Enquanto que o ensaio cometa detecta danos que poderão ser corrigidos posteriormente pelo sistema de reparo do DNA (HEUSER et al, 2002). O Ensaio Cometa é um método de estudo genotóxico mais sensível e avalia danos ao DNA de células individuais. Analisando índice de dano (ID) através com ensaio cometa, houve uma mudança em relação ao teste do micronúcleo em 2015. Em Toritama não houve diferença significativa entre estação chuvosa e seca (Gráfico 02). Em Santa Cruz do Cabibaribe houve diferença entre as estações, mas com uma inversão, a estação seca apresentou mais danos genéticos do que a estação chuvosa. Em 2015 o Índice de dano do DNA do ponto de Surubim foi muito próximo do controle negativo. Mesmo apresentando diferença significativa entre o controle negativo, podemos dizer que o ambiente está sofrendo menos ações danosas ao material genético. Porém, pode-se perceber que no município de Surubim a estação chuvosa apresenta maiores danos genéticos que na estação chuvosa, sendo possivelmente um dos motivos, o processo de escoamento superficial. Pois os poluentes depositados na superfície do rio são carregados pelo escoamento superficial, levando à ocorrência do que é usualmente descrito como “poluição difusa”. Essas alterações podem ser influenciadas pelo clima, características da bacia e infraestrutura de drenagem que influencia no aumento da geração e do transporte de sedimentos e poluentes por superfícies impermeáveis e atividades urbanas, os quais trazem mudanças químicas, físicas e biológicas ao meio (LAUTZ, 2015).

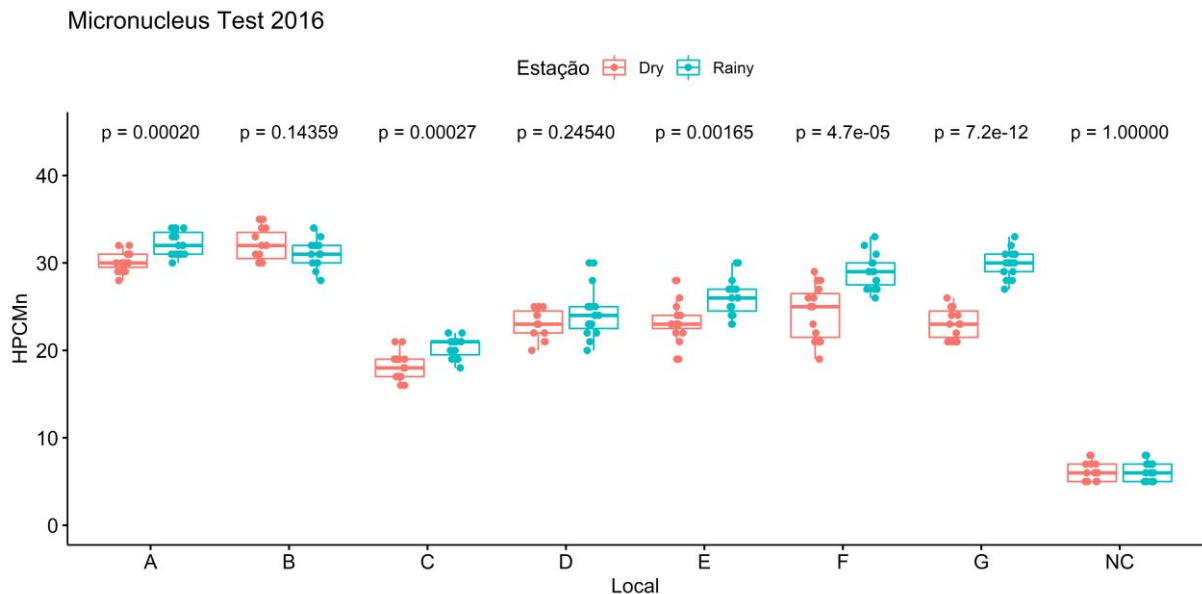
Gráfico 02 - Boxplot do Índice de Dano (ID) das estações chuvosa e seca de espécimes de *O. niloticus* nos sete pontos de coletas no ano de 2015 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo).



Em 2016 a realidade se repete parcialmente (gráfico 03). As estações de coletas apresentam diferença significativa entre as estações seca e chuvosa, onde a estação chuvosa apresenta maiores danos que a seca. Os pontos que não apresentaram diferença significativa entre as estações foram os municípios de Toritama e Limoeiro. Pode ser pelo fato de já existir grande quantidade de poluentes nestes ambientes. Isso é justificado pelo processo de biomagnificação (ou magnificação trófica) que é um fenômeno que ocorre quando há acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para outro ao longo da teia alimentar. Assim, os predadores de topo têm maiores concentrações dessas substâncias do que suas presas. Como Toritama tem muitos dejetos de corantes a base de metais, esses elementos podem ser acumulados na biota, causando alteração nas estruturas gênicas. Já no município de Limoeiro, o alto índice de esgotos domésticos, industriais e hospitalares são responsáveis por essa concentração de substâncias poluentes no rio.

Gráfico 03 - Boxplot do das células micronucleadas (HPCMn) das estações chuvosa e seca de espécimes de *O. niloticus* nos sete pontos de coletas no ano de 2016 (A-Santa Cruz do

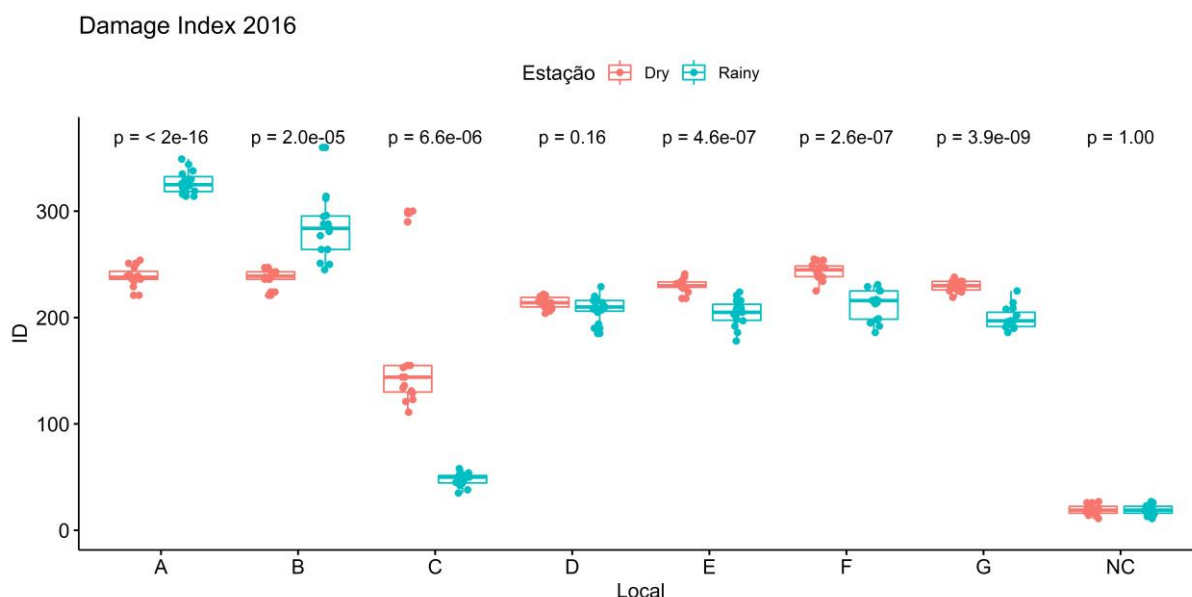
Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo.



Em 2016 analisando os dados do Teste cometa, percebemos que Limoeiro não teve diferença significativa entre as estações seca e chuvosa mostrando a mesma realidade do ano anterior, fruto da Bioacumulação que ocorre num nível trófico e representa o aumento da concentração de substâncias nos tecidos ou órgãos dos organismos. Nos outros pontos, há diferença significativa no índice de dano nas estações. No entanto Santa Cruz do Capibaribe e Toritama apresentaram mais Índices de Danos nas estações chuvosas maior que na estação seca (Gráfico 04). Esse comportamento se dá pela ação da escoamento superficial, acrescentado como a atividade da região que liberam muitos resíduos têxtil com corantes a base de várias substância tóxicas entre elas os metais pesados.

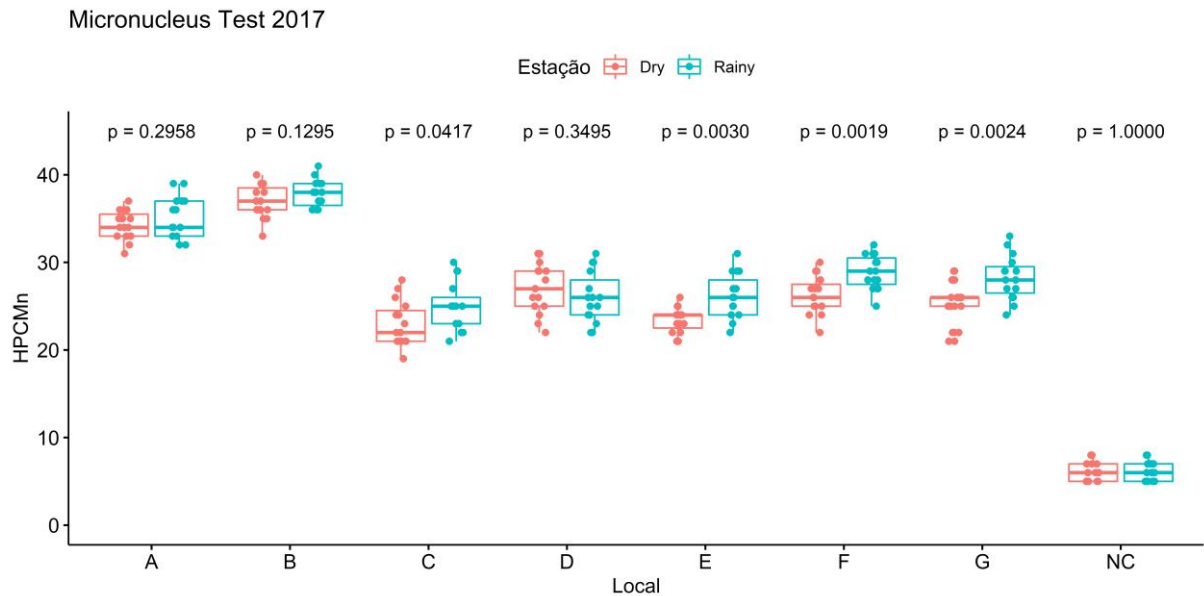
Gráfico 04 - Boxplot do Índice de Dano (ID) das estações chuvosa e seca de espécimes de *O. niloticus* nos sete pontos de coletas no ano de 2016 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-

Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo.



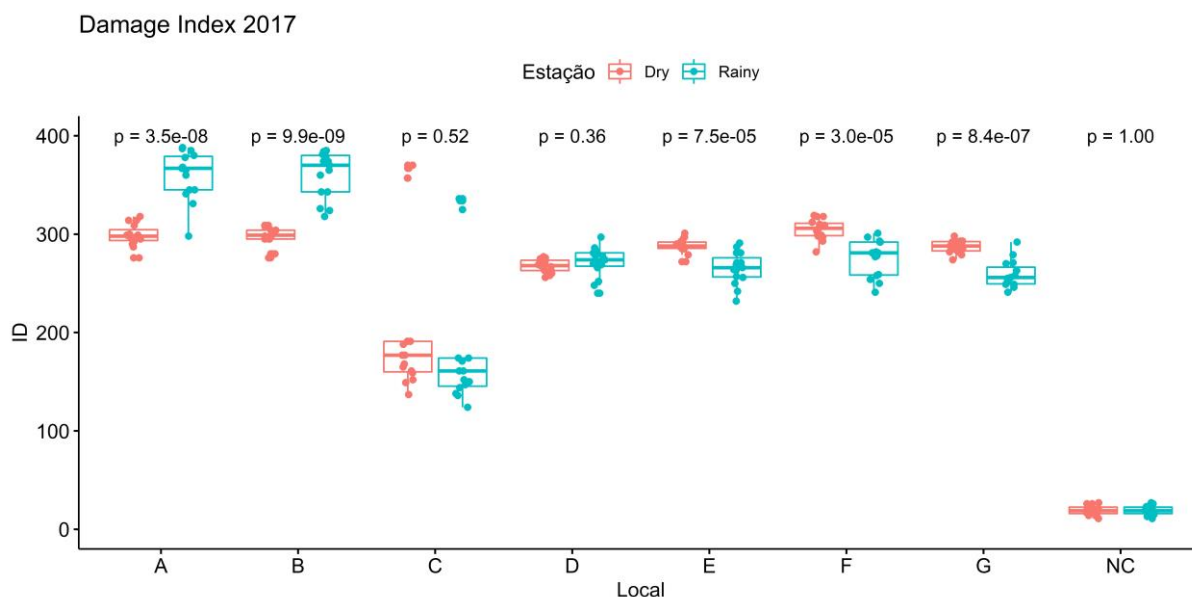
No ano de 2017 em relação aos micronúcleos não existiu padrão entre seco e chuvoso nos locais (Gráfico 05). Alguns não apresentam diferença ($p > 0,05$) entre as estações, como foi o caso de Santa Cruz do Capibaribe, Toritama e Limoeiro. Isto significa que esses ambientes começam apresentar características iguais nas duas estações investigadas. Fenômeno o qual é resultado dos processos de bioacumulação, bioconcentração e biomagnificação. No município de Limoeiro a presença de micronúcleo foi o inverso dos anos anteriores, a estação seca apresentou mais dano que a estação chuvosa.

Gráfico 05 - Boxplot do das células micronucleadas (HPCMn) das estações chuvosa e seca de espécimes de *O. niloticus* nos sete pontos de coletas no ano de 2017 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo).



Em 2017 todos os pontos apresentam diferença significativa quando comparados sobre os índices de danos genéticos. Os pontos de Santa Cruz, Toritama e Limoeiro apresentaram maiores danos nas estações chuvosas. Característica influenciada pela lixiviação e escoamento superficial. Os demais pontos apresentaram maiores danos na estação seca (Gráfico 06).

Gráfico 06 - Boxplot do Índice de Dano (ID) das estações chuvosa e seca de espécimes de *O. niloticus* nos sete pontos de coletas no ano de 2017 (A-Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE; G-Recife e NC- Controle Negativo).



Parâmetros físico-químicos normalmente são um dos primeiros utilizados em programas de monitoramento de ambientes aquáticos (Araújo e Oliveira, 2013). A qualidade da água do rio Capibaribe foi investigada e os resultados obtidos foram comparados com os índices propostos pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357/2005).

Os resultados indicam que os pontos investigados apresentam resultados distintos, revelando diferentes níveis de contaminação e desacordo com os limites máximos estabelecidos pela legislação. Em relação a turbidez, Santa Cruz do Capibaribe e Toritama estavam em desacordo com os limites estabelecidos por lei, abaixo de 100 Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU) nas duas estações dos três anos investigados, enquanto que Surubim apresentou não conformidade apenas na estação de estiagem (2017). Isso pode ser explicado pelo fato de que durante a coleta a região estava em período de seca. Como Surubim é local de abastecimento de parte da região, ocasionou uma baixa no nível da água, para suprir a demanda regional. Esse aumento da turbidez influencia à redução da transparência da água, sendo promovida pelo material em suspensão que provoca a reflexão da radiação, prejudicando a passagem dos raios solares pela água (TOMAZONI et al., 2005).

Essa dificuldade da entrada de luz pode provocar alterações no sistema aquático ocasionando mudanças nas taxas fotossintéticas de macrófitas e algas subsuperficiais, além de favorecer a proliferação de cianobactérias produtoras de toxinas e reduzir a quantidade de oxigênio dissolvido, provocando assim a morte dos peixes (FAY e SILVA, 2006). Essa

turbidez também pode estar associada a problemas como assoreamento de rios e barragens, os quais arrastam nutrientes e contaminantes ocasionando degradação de ambientes aquáticos, com o transporte de sedimentos (CARRERAS, 2010).

A condutividade pode ser relacionada com a presença de íons dissolvidos na água. Em legislação nacional não há padrões para condutividade em corpos d'água, mas em geral níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ indicam ambientes impactados. Geralmente em corpos d'água que recebem efluentes a condutividade pode atingir 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (LIBÂNIO, 2005). No ano de 2015 apenas Surubim não apresentou condutividade fora do recomendado.

Em 2016, novamente, o ponto de Surubim, na estação chuvosa estava de acordo com a legislação. Já em 2017 nenhum ponto apresentou conformidade. Com a condutividade pode-se estimar a salinidade da água. Os sais se dissolvem dando origem a íons de carga oposta e, portanto, contribuem para a condutividade elétrica da solução. Essas alterações podem indicar perturbação do sistema, seja por causas naturais, como inundações e secas, seja por interferência humana, como, por exemplo, através do despejo de efluentes, inclusive de poluição (SOMMER, 2004).

Em relação aos sólidos totais dissolvidos, apenas Santa Cruz do Capibaribe e Toritama apresentaram valores diferentes da normalidade durante a estação Chuvosa (2015). Em 2016 os resultados foram semelhantes. Já em 2017, apenas na estação de estiagem, todos os pontos estiveram fora da legislação.

Quando analisado o pH foi observado que na estação chuvosa de 2015 apenas Santa Cruz do Capibaribe e Toritama apresentaram pH fora do permitido. Por outro lado, na estiagem apenas Surubim esteve de acordo com o padrão, similarmente ao que ocorreu no ano de 2016. Já no ano de 2017 na estação chuvosa Santa Cruz do Capibaribe, Toritama e Surubim estiveram fora do padrão. Enquanto que na estação de estiagem todos os pontos estiveram em não conformidade.

A alteração no pH pode ser resultado de fatores naturais e/ou antrópicos. A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies, uma vez que valores de pH afastados da neutralidade pode afetar o equilíbrio e a taxa das reações químicas. Para que se conserve a vida aquática, o pH ideal deve variar entre a faixa de 6 a 9 (BRASIL, 2005).

Em relação ao Oxigênio dissolvido, os pontos de Santa Cruz do Capibaribe e Toritama apresentaram valores fora do padrão de 5mg/l em todos os períodos dos três anos

investigados. Esses níveis baixos se dão pelo alto índice de poluentes presentes na água, proveniente de esgotos urbanos e industriais.

Em 2015 Limoeiro e o Cavouco/UFPE também apresentaram baixo nível de oxigênio dissolvido na estação chuvosa. Em 2016 São Lourenço da Mata e Recife apresentaram níveis de oxigênio dissolvido abaixo do permitido na estação de estiagem e, na estação chuvosa, apenas São Lourenço. Oxigênio dissolvido é indispensável aos organismos aeróbios e sua ausência pode afetar significativamente a biota aquática sendo, portanto, determinante na manutenção da vida aquática.

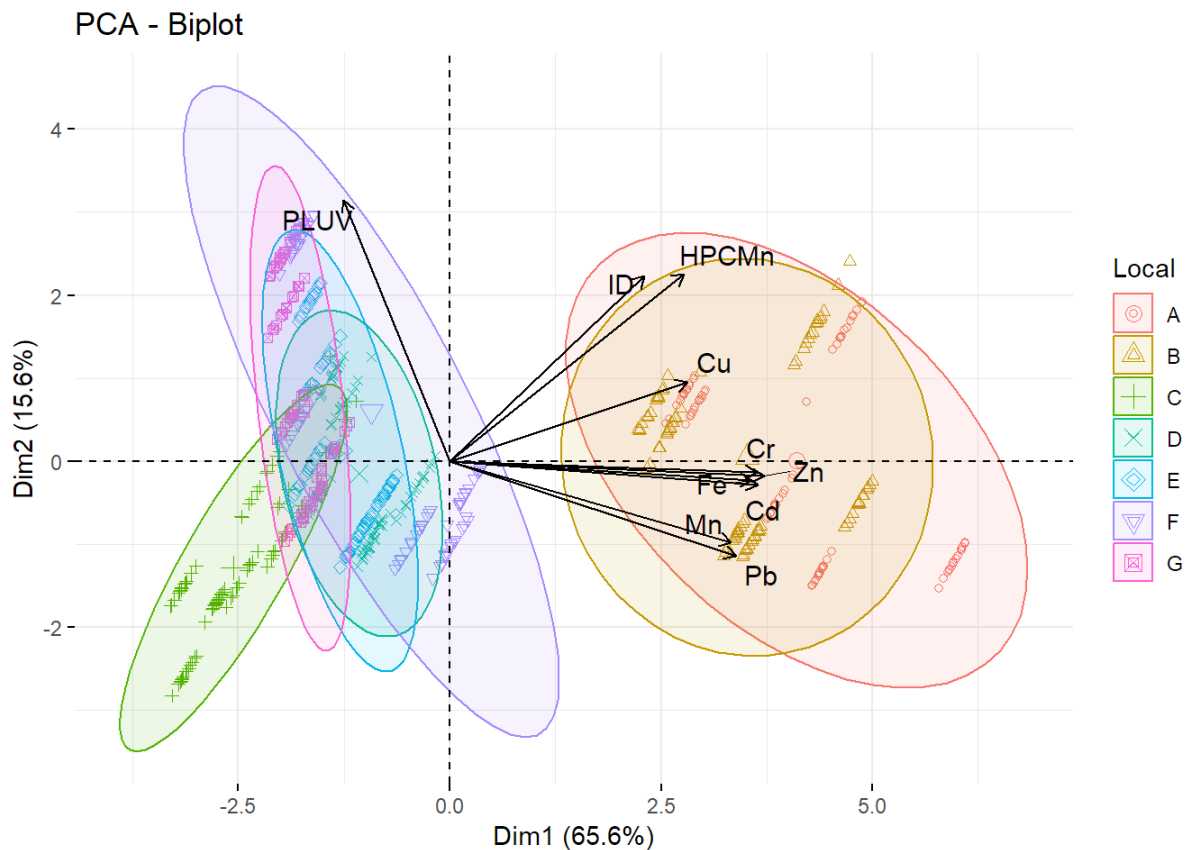
Durante a degradação da matéria orgânica, as bactérias fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, podendo vir a causar uma redução de sua concentração no meio (MOTA, 2012). Em 2017 Surubim começou a ter o oxigênio dissolvido abaixo e aceitável e continuou na estação de estiagem de 2017. Recife também apresentou baixa de oxigênio dissolvido na estação chuvosa de 2017.

Em relação aos metais pesados, foi verificado que Ferro (Fe), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cromo (Cr) e Cádmio (Cd) encontravam-se acima do permitido pela legislação (CONAMA 357/2005), sendo os pontos SAC e TOR os mais impactados. Esses pontos se destacam no impacto ambiental, pelo fato da economia e pratica local, onde a principal atividade econômica é a indústria têxtil. Nesses municípios há uma pratica de que todos os dejetos de tinturas e lavagens têxtil sejam despejados sem tratamento nas águas do rio Capibaribe, tornando assim a água com altos níveis de metais. Segundo a Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (CPRH) só no município de Toritama existem mais de 2.500 fábricas de jeans e para cada lavagem de uma única peça são usados, em média, cem litros d'água (CPRH, 2018).

A legislação estabelece que a concentração máxima de Ferro seja de 0,3mg/L, Chumbo 0,01 mg/L, Zinco 5 mg/L, Manganês 0,1 mg/L, Cromo 0,05 mg/L e Cádmio 0,001 mg/L de emissão nos rios e, no presente trabalho esses metais estavam em desacordo com o estabelecido. Esses dados são preocupantes, pois a maioria dos metais apresentam efeitos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos em humanos e animais (MOUNT e HOCKETT, 2000). Sendo, portanto, uma das formas de contaminação do meio ambiente, que tem trazido mais preocupações aos pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle de poluição (BELO et al., 2010).

O gráfico 07 é um resumo das análises realizadas neste trabalho em relação as diferentes variáveis estudadas. Observe que os locais A (Santa Cruz do Capibaribe) e B (Toritama) apresentam características diferentes dos demais. Isso acontece por vários fatores, como: maiores níveis de metais pesados, maiores índices de danos genéticos e a maior quantidade de células com micronúcleo. Pode-se visualizar que existe uma correlação entre os danos genéticos e os níveis de metais. Também há uma correlação entre danos genéticos e pluviosidade, mas somente na presença de poucos metais. É possível perceber que a concentração dos metais esta relacionada ao aumento dos danos genéticos e a pluviosidade.

Gráfico 7 – Gráfico de Análise de componentes principais (PCA) com os dados de coletas dos três anos (2015, 2016 e 2017). Por apresentarem muitas variáveis [Pluviosidade (PLUV), Índice de Dano (ID), Células Micronucleadas (HPCMn) e metais]. Escolhemos o Gráfico PCA-Biplot, o qual representa de forma mais didática as variações dos dados. (A- Santa Cruz do Capibaribe; B-Toritama; C-Surubim; D-Limoeiro; E-São Lourenço da Mata; F-Richo do Cavouco/UFPE e G-Recife).



Os resíduos descartados de forma inadequada no ambiente investigado foram determinantes para os resultados obtidos. Os pontos revelam o índice de danificação genômica (ID) no DNA de espécimes de *O. niloticus* coletados em sete pontos estratégicos do rio Capibaribe durante o período 2015 a 2017. Os resultados demonstram que o ano de 2017 foi o que apresentou o maior ID seguido dos anos de 2016 e 2015.

Os resultados de genotoxicidade demonstraram que os pontos Santa Cruz di Capibaribe e Toritama foram os mais impactados em todos os períodos investigados, corroborando com as análises físico-químicas da água. Esses dados são reflexos das atividades industriais que ocorrem nessas localidades, o que vem contribuindo para o elevado índice de poluentes e, consequentemente, de danos nos organismos que ali habitam.

Por outro lado, Surubim apresentou um menor ID nos três períodos investigados. Porém, no período de estiagem de 2016 o ID aumentou consideravelmente (gráfico 04). Santa Cruz do Capibaribe, Toritama e Surubim pertencem à mesma região (Agreste) do estado pernambucano. No entanto, Santa Cruz do Capibaribe e Toritama sofreram efeitos de genotoxicidade diferentes do observado em Surubim. Essa diferença ocorreu, possivelmente, devido a dois fatores: 1. Ao período de seca que ocorreu no local no ano de 2016 para 2017 e 2. Ao fornecimento de água que Surubim representa para a localidade, sendo a principal fonte de água para região. Esses fatores naturalmente contribuíram para a redução do volume da água consequentemente aumentando a concentração de substâncias nocivas no ambiente aquático induzindo alterações físico-químicas na água e danos genéticos aos animais.

Os demais pontos Limoeiro, São Lourenço da Mata, Cavouco/UFPE e Recife, embora impactados, também foram alvos de ações de urbanização com despejos de esgotos residências e industriais. Porém, esses ambientes não sofreram a mesma interferência de genotoxicidade que os ambientes que receberam poluição têxtil.

Este trabalho utilizou o boxplot para representação de alguns dados, uma vez que ele pode ser empregado para uma comparação visual entre dois ou mais grupos, além de se comparar a variabilidade entre eles, a mediana, dentre outros parâmetros.

Os resultados de ID demonstram alta danificação genômica nos espécimes de *O. niloticus* coletados no rio Capibaribe em comparação aos espécimes controle. Estes resultados indicam a presença de agentes genotóxicos nesse ambiente, conforme os dados encontrados na análise físico-química. Muitas das substâncias químicas, tais como os metais, são conhecidos por terem ação mutagênica e carcinogênica, pois interagem quimicamente com o

material genético, formando adutos ou até mesmo quebras da molécula de DNA (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011; OBIAKOR et al., 2012).

As alterações no DNA dos organismos podem ocasionar sérias consequências, já que em nível individual lesam células e órgãos, podendo afetar uma série de funções fisiológicas no organismo (SCALON, et al., 2010; BOLOGNESI e HAYASHI, 2011).

Outro parâmetro avaliado neste trabalho corresponde a correlação do ID e MN em ambos os períodos (seco e chuvoso) durante os três anos de monitoramento. A Figura 04 mostra como se comporta o ID e o dano genético estocástico (MN) nas estações chuvosas (junho/julho) e de estiagem (outubro/novembro) de 2015, 2016 e 2017, respectivamente.

No ano de 2015 a pluviosidade não aparentava influenciar danos genéticos em Santa Cruz do Capibaribe e Toritama. Já em 2016 e 2017 fica evidente que quanto maior a pluviosidade maior os danos genéticos (ID e MN). Já no município de Surubim os resultados foram diferentes entre os anos. Em 2015 foi detectado poucos danos genéticos. Sendo suas maiores alterações na estação chuvosa. Em 2016 os maiores ID foi na estação seca. Já em 2017 foi equivalente os danos em ambas as estações. Isso pode ter acontecido, devido ao fato de que o ponto de coleta teve um nível baixo de água, devido à seca na região, oscilando assim os números. Os dados revelam que o ID e o acúmulo de aberrações genéticas (representado pelo MN) sofrem influência sazonal, ou seja, em período chuvoso existe uma degradação maior ao material genético e, conseqüentemente um acúmulo dessas alterações.

O presente estudo investigou a qualidade da água e demonstrou os efeitos genotóxicos e mutagênicos ocasionados em diferentes pontos do rio Capibaribe. Similarmente, Barbosa et al., (2010), avaliando o efeito de genotoxicidade detectaram aumento na atividade Clastogênica, por meio do ensaio cometa, o qual relacionaram aos elevados níveis de metais pesados no ambiente. Nossos resultados confirmam que os testes utilizados são sensíveis para detectar efeitos genotóxicos induzidos por contaminantes químicos liberados no meio aquático. Com o aumento de metais pesados foi possível identificar aumento no índice e frequência de danos e de micronúcleos em *O. niloticus*.

Esse potencial de genotoxicidade de vários metais, como o Cromo foi demonstrado por vários autores através de teste do micronúcleo. Para Matsumoto et al. (2006), as concentrações totais de Cromo de 0,01 mg/ml foram capazes de promover várias alterações no DNA de *O. niloticus*. Esses efeitos são devido à forte atividade tóxica que as altas concentrações de metais podem exercer sobre células de peixe (CAVAS et al., 2005).

Similarmente, Dourado et al., (2017), observaram efeitos genotóxicos e mutagênicos em eritrócitos da espécie do peixe *Astyanax altiparanae* após exposição da água ao descarte inadequado de resíduos industriais.

Os resultados apresentados no presente trabalho apontam para a necessidade de um programa de gerenciamento de resíduos que ofereça eficientemente a correta destinação dos efluentes e resíduos que atualmente são liberados sem tratamento prévio no rio Capibaribe a fim de melhorar a qualidade da água e vida desse ecossistema.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados confirmam que o rio Capibaribe encontra-se impactado a nível físico-químico, genotóxico e mutagênico, como resultado do descarte inadequado de resíduos local dificultando a qualidade da água e manutenção de vida aquática. Essas informações poderão servir de subsídio à tomada de decisão pelos órgãos ambientais regionais responsáveis pela gestão dos recursos hídricos, uma vez que os resultados auxiliam a traçar um perfil de conservação e assim gerar melhorias para resgatar a qualidade da água e vida do “Capibaribe”.

REFERÊNCIAS

- AKINBORO, A., Mohammed, K., Rathnasamy, S., & Muniandy, V.R. (2011). Genotoxicity assessment of water samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, using the *Allium cepa* test. *Tropical Life Sciences Research*, 22, 23–35.
- Alegre, v. 17, n. 4, p. 218-224, out./dez. 2007.
- ARAUJO, J.G. anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. *Environ Sci Pollut Res* 21:6258– 6262. 2014.
- ARAUJO MC, Oliveira MBM 2013. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. *Revista Ambiental Água* 8(3):247-257.

ASSIS, C. R. ; Araújo, MC ; ARAUJO, A. V. ; MARCEL, F. ; MEDEIROS, A. C. ; BEZERRA, R. ; BEZERRA JUNIOR, L. ; OLIVEIRA, M.B.M. alterações bioquímicas na tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1757) ocasionadas pela poluição no riacho do cavouco: perspectiva de monitoramento utilizando biomarcadores enzimáticos In: Maria Betania Melo de Oliveira/Rodrigues Gonçalves/Kenia Valença. (Org.). Riacho Cavouco: que Riacho é Esse?. 1ed. Recife: Editora Universitaria, p. 33-50, 2014.

BARBOSA, J.S. ; Cabral a , T.M. ; Ferreira b , D.N.; Agnez-Lima a , L.F.; Batistuzzo de Medeiros S.R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010.

BELO, A.; QUINÁIA, S. P.; PLETSCH, A. L. Avaliação da contaminação de metais em sedimentos superficiais das praias do lago de Itaipu. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 613-617, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300024> Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 39(2): 169 – 177, 2013 Bol. Inst. Pesca, São Paulo, 39(2): 169 – 177, 2013

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.

CARRERAS, N. M. et al. The use of sediment colour measured by diffuse reflectance

CPRH – AGENCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS. Relatório das Bacias Hidrográficas de Pernambuco. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br>. Acesso em 18/11/2018.

DOURADO, P.L.R; ROCHA, M.P; ROVEDA, LM; JUNIOR, J.L.R. ; CÂNDIDO, L.S.; CARDOSO, C.A.L.; MORALES, M.A.M ; OLIVEIRA, K.M.P; GRISOLIA, A.B. Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 1, 123-133 (2017).

FAY, E. F.; SILVA, C. M. M. S. Índice de uso sustentável da água (ISA – Água) na região do sub - médio São Francisco. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.p. 157.

FERNANDEZ, Liana L. et al. Ferro e neurodegeneração. *Scientia Medica*, Porto (Luxembourg). *Journal of Hydrology*, Luxembourg, v. 382, p. 49-63, 2010.

FONSECA, I.C. & MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 148-158.2006.

FONSECA, I.C. & MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 148-158.2006. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. Maringá, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011. Hematology, micronuclei and nuclear

abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. Maringá, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011.

ILIDIA da A. G. Martins Juras - consequências do uso do chumbo na pesca. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, Centro de Documentação e Informação Coordenação de Biblioteca, 2006.

KOUSAR, S.; JAVED, M. Diagnosis of Metals Induced DNA Damage in Fish Using Comet Assay (2015). *Pak Vet J*, 35(2): 168-172.

KOUSAR, S.; JAVED, M. Diagnosis of Metals Induced DNA Damage in Fish Using Comet Assay (2015). *Pak Vet J*, 35(2): 168-172.

LEVY, E. et al. Os 10 Mandamentos do Sistema Imunológico. 2ª ed. São Paulo, pag. 84. 2001. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=iAcYbvrefQC&pg=PA84&dq=zinco&hl=ptPT&sa=X&ei=xdReUa2nBZXI4AOtYH4Bw&ved=0CFQQ6AEwBg#v=onepage&q=zinco&f=false>. Acesso em: 16/11/2018.

M. C.; WEITZMAN, M. J. 2007. Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre a conservação de peixes de água doce Neotropical. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. 2007.

MALUF, S.W.D.; RODRIGUES, M.A.S.; SILVA, L.B.F. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. *Braz. J. Biol.*, 2010, vol. 70, no. 4 (suppl.), p. 1217-1222

MATSUMOTO, S.T., MANTOVANI, M.S., MALAGUTTI, M.I.A., DIAS, A.L.,

MATSUMOTO, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.U., Fonseca, I.C., MarinMorales, M.A., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.* 29, 148–158.

MAVROPOULOS, Elena. A hidroxiapatita como absorvedor de metais. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999.

MELLANBY, K. Biologia da poluição. (Tradução de Lúcia B. Lamberti, revisão de Antonio Lamberti). São Paulo: EPU: Ed. Da Universidade de São Paulo, 1982.

MOTA, S. Introdução à engenharia ambiental. 5. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2012

OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, F. A. C.; OLIVEIRA, G. X. S.; BORGES, V. P. Evaporação da água de reservatórios: Medição e estimativa por métodos meteorológicos. In: Recursos hídricos em regiões semiáridas: estudos e aplicações. INSA, p.44- 73, 2012.

OSMAN , S. M.; Piedade, M. T. F. "Effects of crude oil on survival, morphology, and anatomy of two aquatic macrophytes from the Amazon floodplains". Hydrobiology, 2014.

PALANIKUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N. Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. Genetika, v. 47, p. 1169-1174, 2011.

PEREIRA, RS. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Rev Elet Recursos Hídricos, 2004.

PINHEIRO, D.A. ; DIAS, M.T. ; DIAS, M.K.R. ; SANTOS, E.F. ; MARINHO, R.G.B.

PORTO JI, ARAUJO CS, FELDBERG E. Mutagenic effects of Mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. Environ Res 97:287–292. 2005.

PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife- PE, Brazil and its importance to public health. African Journal of Microbiology Research. Vol. 11(28), pp. 1142-1149, 28 July, 2017. DOI: 10.5897/AJMR2017.8577. quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, v. 175, p. 184–191, 1988. quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, v. 175, p. 184–191, 1988. R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. Aquatic Toxicology, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013.

RADIC S, Stipanicev D, Vujcic V and Rajcic MM (2010) The evaluation of surface and waste water genotoxicity using the *Allium cepa* test. Sci Total Environ 408:1228-1233.

SALVADOR-JR; SILVA.F.A. Actinopterygii, Siluriformes, Callichthyidae, Hoplosternum littorale (Hancock, 1828): Distribution extension in the upper São Francisco River region, southeast Brazil. Check List | Volume 7 | Issue 5 | ISSN 1809-127X (online edition), 2011.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON. J. A. S. Peixes comerciais de Manaus, 2005.

SCALON, M.C.S.; RECHENMACHER, C.; KAYSER, M. L.C.; RODRIGUES, M.T.C.; MALUF, S.W.D.; RODRIGUES, M.A.S.; SILVA, L.B.F. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. Braz. J. Biol., 2010, vol. 70, no. 4 (suppl.), p. 1217-1222

SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. Analytical Biochemistry, Bethesda, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, mai. 1977.

SILVA, F.A et al. Genomic Organization Under Different Environmental Conditions: Hoplosternum Littorale as a Model. Zebrafish Volume 13, nº 3, Doi: 10.1089/zeb.2015.1237. 2016.

SILVA, J.M et al. Determination of genotoxic effect of trifluralin on *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae, Cuvier, 1816) using a multibiomarker approach. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* v. 12, n. 1, , 85-93 doi: 10.5132/eec.2017

BEZERRA, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for SIZER, F. et al. *Nutrição Conceitos e Controvérsias*. Oitava edição, Cap. 8 pag. 290. 2003. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=5SAsxSpZ5gIC&printsec=frontcover&hl=ptPT#v=onepage&q&f=false>. Acesso em 16/11/2018.

SOARES, M. G. M.; COSTA, E. L.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K.; ANJOS, H. D. B.; YAMAMOTO, K. C.; FREITAS, C. E. C. 2008. *Peixes de lagos do médio Rio Solimões*. 2a ed. rev. Manaus: Instituto Piatam. 160pp.

SOMMER, K.; SPITZER, P. Session H: Ocean Salinity (Powerpoint). In: Plenary lectures: WMO-BIPM WS Geneva 30 março - 1 abril, 2004.

SOUZA, M. S et al. Avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos (Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas. *Acta Toxicol. Argent.* 24 (3): 193-199, 2016.

SOUZA, P.R. et al. Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. *Aquatic Toxicology* 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.008>. 2018.

spectrometry to determine sediment sources: Application to the Attart River catchment
The first evidence of cholinesterase in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure. *Environmental Toxicology*. Doi 10.1002/tox.2012. The first evidence of cholinesterase in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure. *Environmental Toxicology*. Doi 10.1002/tox.2012.

THOMÉ, R.G.; SILVA, P.M.; SANTOS, H.B. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. *Revista Conexão Ciência* Vol. 11; nº 2; 2016.

TOMAZONI, J. C.; Mantovani, L. E.; Bittencourt, A. V. L.; Rosa Filho, E. F. da. Utilização de medidas de turbidez na quantificação da movimentação de sólidos por veiculação hídrica nas bacias dos rios Anta Gorda, Brinco, Coxilha Rica e Jirau – sudoeste do estado do Paraná. *Boletim Paranaense de Geociências*, v.57, p. 49-56, 2005

WANG. Y., CHEN, C., ZHAO, X., WANG. Q., QIAN. Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 122 (2015) 81–85. 2015.

YAMAMOTO, K. C.; FREITAS, C. E. C. 2008. Peixes de lagos do médio Rio Solimões. 2a ed. rev. Manaus: Instituto Piatam. 160pp.

3.2 ARTIGO 2

Efeitos genotóxicos e mutagênicos em *Oreochromis niloticus* provenientes de três Barragens de abastecimento de um rio urbano no Nordeste do Brasil

Este artigo será submetido à revista
Ecotoxicology and Environmental Safety
Qualis:A2
ISSN: 0147-6513
Fator de Impacto:3.974

Corresponding author:

Maria Betânia Melo de Oliveira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540 Recife, PE, Brazil;

E-mail address: maria.bmoliveira@ufpe.br

Efeitos genotóxicos e mutagênicos em *Oreochromis niloticus* provenientes de três Barragens de abastecimento de um rio urbano no Nordeste do Brasil

Jordany Gomes da Silva^{1,3}; Marlyete Chagas de Araújo¹; Cristiano Chagas³; Maria Betânia Melo de Oliveira²; Ranilson de Souza Bezerra¹.

1-Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

2-Laboratório de Biologia Molecular – BioMol, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

3-Laboratório de Biotecnologia e Fármaco vinculado ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

O rio Capibaribe é um dos principais rios do estado de Pernambuco e recebe efluentes sem tratamento proveniente de atividades industriais, agropecuárias, hospitalares, turísticas e domésticas. Essa carga poluente pode induzir nas espécies desse ecossistema uma série de alterações genéticas podendo comprometer sua sobrevivência ou levar os organismos a morte. A redução da biodiversidade aquática provocada por esses contaminantes, por sua vez, prejudica as comunidades ribeirinhas que dependem da pesca como seu principal meio de subsistência. O objetivo desse trabalho foi realizar o biomonitoramento em três barragens de abastecimento situadas ao longo da bacia do rio Capibaribe (Barragem de Carpina, Barragem de Jucazinho e Barragem de Tapacurá) por meio do efeito genômico (Ensaio Cometa) e mutagênico (Teste de Micronúcleo) em células sanguíneas de *Oreochromis niloticus*. Coletas mensais (15 espécimes) foram realizadas em cada barragem durante os anos de 2016 e 2017 e, adicionalmente foi realizada análise comparativa dos índices pluviométricos mensais disponibilizados pela Agência Pernambucana de Águas e Climas – APAC. Os resultados evidenciaram níveis de danos genômicos (micro e macrolesões no DNA) consideravelmente altos em todos os períodos analisados ($p < 0,05$). Entretanto esses danos foram mais

significativos no ano de 2017 em todas as barragens investigadas, sendo a de Jucazinho a mais impactada. Estes resultados confirmam a presença de agentes genotóxicos nos ambientes investigados e demonstram forte associação entre elevados níveis de danificação (altos índice de dano – ID e frequência de danos – FD) principalmente em locais com grande contingente demográfico. Este é o primeiro biomonitoramento utilizando marcadores genotóxicos em barragens no rio Capibaribe e os resultados aqui apresentados apontam para a necessidade de ações de gerenciamento nestas áreas que encontram-se fortemente impactadas pelas atividades antrópicas.

Palavras-chaves: Biomonitoramento, Ecossistema aquático, Poluição hídrica, Biomarcador.

INTRODUÇÃO

A degradação dos ecossistemas aquáticos está cada vez mais intensa e isso é um reflexo do desenvolvimento urbano e industrial que contribui significativamente com a introdução de compostos químicos (seja por lançamento direto ou indireto) nesses ambientes. Estes contaminantes são provenientes de despejos domésticos, industriais e da agricultura que lançados ao meio ambiente de forma inadequada comprometem não só o equilíbrio ecológico como também a saúde humana (Ghisi et al., 2014). Um dos maiores problemas causados aos seres humanos pela poluição hídrica é o acometimento de doenças. Aproximadamente 80% de todas as doenças de origem hídrica e mais de um terço das mortes em países em desenvolvimento são causadas pelo consumo de água e alimentos contaminados (IBGE, 2014). Esta é uma preocupação mundial, entretanto no Brasil esta é uma problemática recorrente uma vez que grande parte das comunidades ribeirinhas utilizam recursos pesqueiros, sobretudo para subsistência (Souza et al., 2013).

O rio Capibaribe situado no Nordeste do Brasil é um dos principais rios do estado de Pernambuco. Este rio abastece 43 municípios do Agreste, Zona da Mata e Litoral do estado pernambucano (Fernandes et al., 1999). A pesca artesanal representa uma das principais atividades desenvolvidas pelas comunidades ribeirinhas dessa região, e um dos recursos

pesqueiros mais consumidos por estas comunidades é o peixe conhecido como Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A Tilápia é um peixe de origem africana que foi introduzida no Brasil tanto para melhorar a produtividade pesqueira bem como para auxiliar o desenvolvimento da aquicultura (Lèveque, 2002). No Nordeste do país essa espécie foi introduzida em 1971 (Lovshin, 2000). Segundo Assis et al., 2014 as tilápias são caracterizadas por serem peixes altamente resistentes a ambientes impactados e capazes de tolerar baixos níveis de oxigênio. Destacam-se também por possuírem boas características nutricionais, como carne saborosa com baixo teor de gordura (0,9g/100g de carne) e calorias (172Kcal/100g de carne). Estas características tornam a Tilápia uma espécie de grande valor ecológico e econômico (Moreira et al., 2001).

Nesse contexto, os peixes têm sido frequentemente empregados como indicadores biológicos da qualidade dos ecossistemas aquáticos (Wang et al., 2015; Javed et al., 2016; Hussain, 2017) e os biomarcadores de danos genéticos têm sido amplamente utilizados para esse fim (Thomé et al., 2016; Braham, 2017; Silva et al., 2017), dada sua capacidade de avaliar a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos que induzem alterações importantes no organismo, além de serem métodos diagnósticos rápidos, precisos e de baixo custo.

Este trabalho teve como objetivo monitorar o impacto ambiental causado em três barragens do rio Capibaribe, Pernambuco - Brasil, por meio de biomarcadores genotóxicos e mutagênicos de *O. niloticus*.

MATERIAL E MÉTODO

METODOLOGIA

As barragens foram escolhidas devido sua representação em toda região, são elas: Barragem de Jucazinho, Barragem de Carpina e Barragem de Tapacurá. Espécimes juvenis de tilápias foram coletadas durante os anos 2016 e 2017. Foi requerida espécimes de tilápias juvenis *Oreochromis niloticus* dos tanque de controle do departamento de piscicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Para o controle positivo foi aplicado 0,3ml de ciclofosfamida. Para o manuseio com peixes nos locais de coleta e nos laboratórios foi pedido o certificado do CEUA-Conselho de Ética no Uso de Animais na comissão de ética animal da Universidade Federal de Pernambuco, com o número de protocolo 004.533/2015.

Para a coleta do tecido sanguíneo, o animal foi retirado da água e imediatamente envolvido em um pano de algodão umedecido com água. Logo após, foi feita uma secção da veia caudal para coleta do sangue com auxílio de seringas de insulina previamente heparinizadas para realização dos ensaios genotóxicos. Em seguida foram realizados os procedimentos do ensaio cometa, conforme protocolo de Ostling e Johanson (1984), modificado em 1988 por Singh et al. e revisado por Tice et al. (2000), além do teste de micronúcleo proposto por Schmid (1975).

Área de Estudo:

Foi realizado um biomonitoramento em três barragens de abastecimento do Rio Capibaribe: Barragem de Jucazinho (entre o município de Cumaru e Surubim); Barragem de Carpina (Município de Carpina) e Barragem de Tapacurá (município de São Lourenço da Mata e Vitória de Santo Antão-PE). Esses locais foram escolhidos devido a importância desses reservatórios para economia e subsistência da comunidade local. Foram coletados mensalmente 15 indivíduos da espécie *O. niloticus* em cada barragem investigada no período de Janeiro de 2016 a Dezembro de 2017 (Figura 1).



Figura 1: Localização da bacia hidrográfica do Rio Capibaribe, com a identificação das barragens estudadas. A - Barragem de Jucazinho (8°2'0"S; 36°9'0"W), B - Barragem de Carpina (7°53'28"S; 35°21'45"W) e C- Barragem de Tapacurá (8°3'21"S 35°11'14"W).

Teste de micronúcleo

Indicado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. (RIBEIRO et al., 2003). Os micronúcleos (MN) são massas de cromatina, que estão localizados no citoplasma, e provém de material cromossômico não incorporado durante divisão celular, resultado de danos não reparados ou reparados erroneamente. Para a análise foi utilizado foi cinco microlitros do sangue coletado de cada animal. Logo em seguida o sangue foi acrescentado a uma lâmina com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material biológico. Existiu uma preparação prévia dessas lâminas antes da utilização, elas foram lavadas com detergente neutro e água destilada e logo em seguida banhadas em álcool 70% e depositadas em estufa com 80 °C por 15 minutos. Espalhou-se uniformemente 10 µL de laranja de acridina (1 mg/ml) ainda a lâmina aquecida. Direcionadas para secagem por 30minutos (EIJI et al., 1992). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488. Foram contadas 4000 células dos indivíduos e registradas as que apresentavam micronúcleos (OCDE, 2014).

Ensaio Cometa

É um método que consiste, basicamente, em poucas células suspensas em uma fina camada de gel de agarose numa lâmina de microscópio que são lisadas, submetidas à eletroforese e coradas com uma substância (fluorescente ou não) que se liga ao DNA. A corrente elétrica empurra o DNA para fora do núcleo de tal modo que o DNA relaxado, quebrado, ou não, migra no gel em direção ao pólo oposto, sendo que os fragmentos menores migram mais rapidamente. As imagens resultantes que, pela aparência, denominam-se “cometa”, são avaliadas para se determinar os danos ao DNA. Esse teste também é conhecido como SCGE

(Single-Cell Gel Eletrophoresis), é uma técnica a qual tem a finalidade de detectar dano ao DNA em células individualizadas. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. A metodologia usada foi a descrita por Singh et al. (1988) com adaptações. Foi obtido o sangue dos espécimes de *O. niloticus* por punção caudal, utilizando seringas heparizadas.

Por ser um experimento fotossensível é necessário todo procedimento após a coleta do material seja feito em uma sala com luz vermelha. Os 15 µl do sangue coletado foram homogeneizados com 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão, e tal mistura foi depositada em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para o refrigerador (temperatura de 4 °C) por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram depositadas em cubas (sempre protegidas da luz) com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após 48 horas na lise, as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de $\pm$ 300 mA e diferença de potencial de 32V. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para revelação, cada lâmina foi corada com 30µL de solução de brometo de etídio (0, 0002%, p/v). A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546.

Foram analisados 100 nucleóides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleóide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software R (R Core Team, 2015) e IBM SPSS Statistics versão 20. Medidas descritivas das principais variáveis do estudo foram analisadas e seu comportamento foi observado através do boxplots dos dados. As análises

foram realizadas de acordo com a mediana, pois os valores apresentados eram assimétricos não sendo representados pela média.

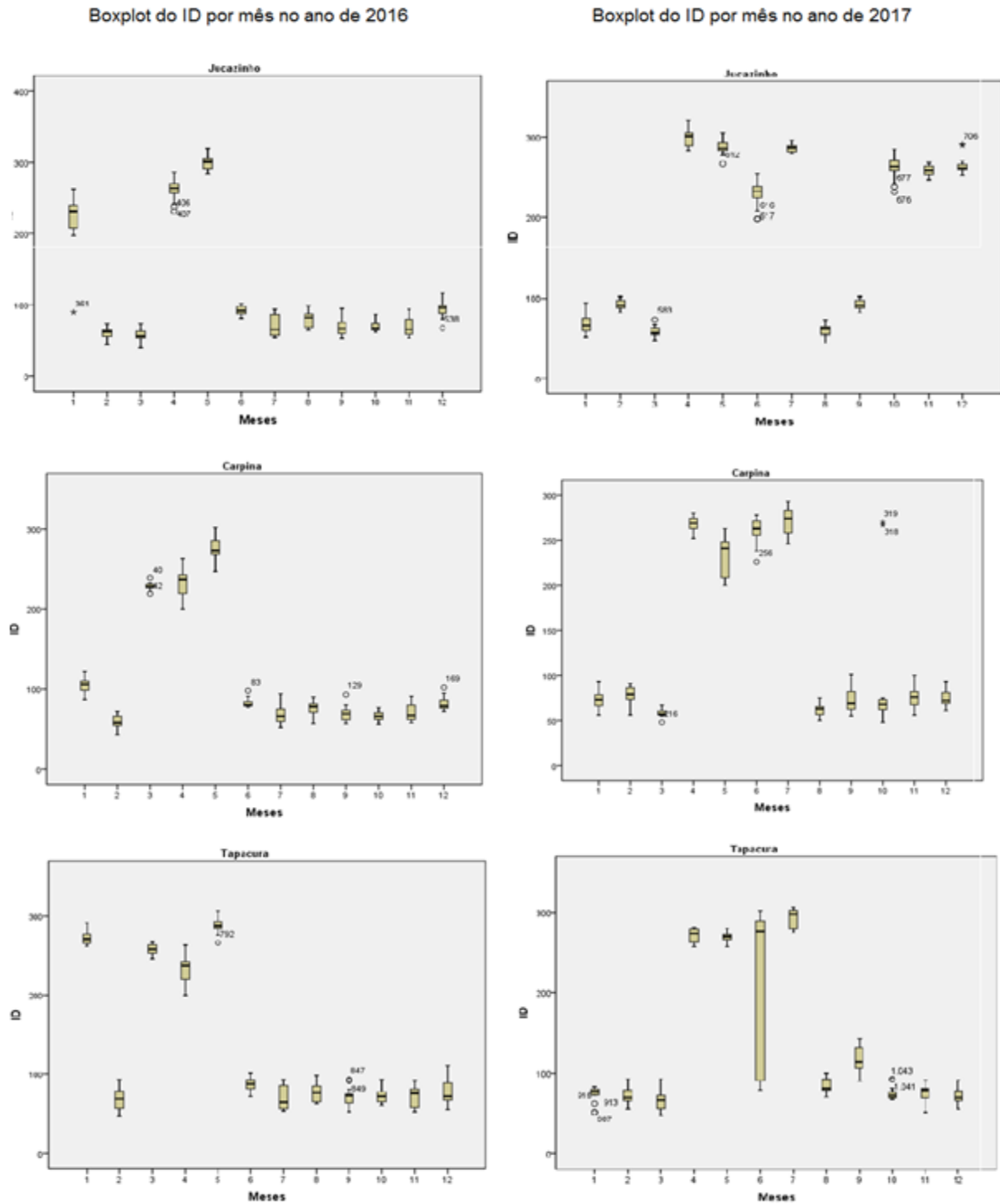
Para o teste cometa foram utilizados dois parâmetros distintos: O índice de dano (ID), calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o número referente ao nível de dano e, a frequência do dano (FD); calculada como a porcentagem de todos os cometas em relação ao número total de células avaliadas. Para tanto, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para k amostras independentes, quando a variância não foi homogênea ($p < 0,05$). Foi aplicado a correlação de borjerroni quando necessário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo corresponde a um monitoramento por meio de análises genotóxicas e mutagênicas do impacto ambiental sofrido em três barragens de abastecimento (Carpina, Jucazinho e Tapacurá) do rio Capibaribe em Pernambuco-Brasil. A Figura 2 reflete o índice de danificação genômica ao DNA de espécimes de *O. niloticus* coletadas nesses ambientes durante os anos de 2016 e 2017.

As barragens sofreram impactos sazonais e temporais. Os resultados mostram que o índice de danos (ID) foi mais significativo no ano de 2017 em comparação ao ano de 2016 em todos os locais investigados. Analisando os períodos, foi possível perceber que em 2016 os danos foram mais significativos nos primeiros meses, havendo uma homogeneidade a partir do mês 07; diferentemente do observado em 2017 onde foi visualizada uma maior variação no ID a partir do mês 04, principalmente nas barragens de Tapacurá e Jucazinho (Fig. 2). A barragem de Jucazinho foi a mais impactada, seguida da barragem de Carpina e Tapacurá. Os danos mais significativos ocorreram nos meses 01, 04 e 05 de 2016 e, 04-07, 10-12 de 2017 na barragem de Jucazinho; 01, 03-05 de 2016 e 03-06 de 2017 com um ID mais expressivo no mês 06 na barragem de Carpina e 03-05 de 2016 e 04-06 de 2017 na barragem de Tapacura. Os demais meses apresentaram decréscimo no ID e, portanto, maior homogeneidade (Fig. 2).

Figura 2: Boxplot do ID mensal de espécimes de *O. niloticus* da barragem de Jucazinho, Carpina e Tapacurá nos anos de 2016 e 2017.



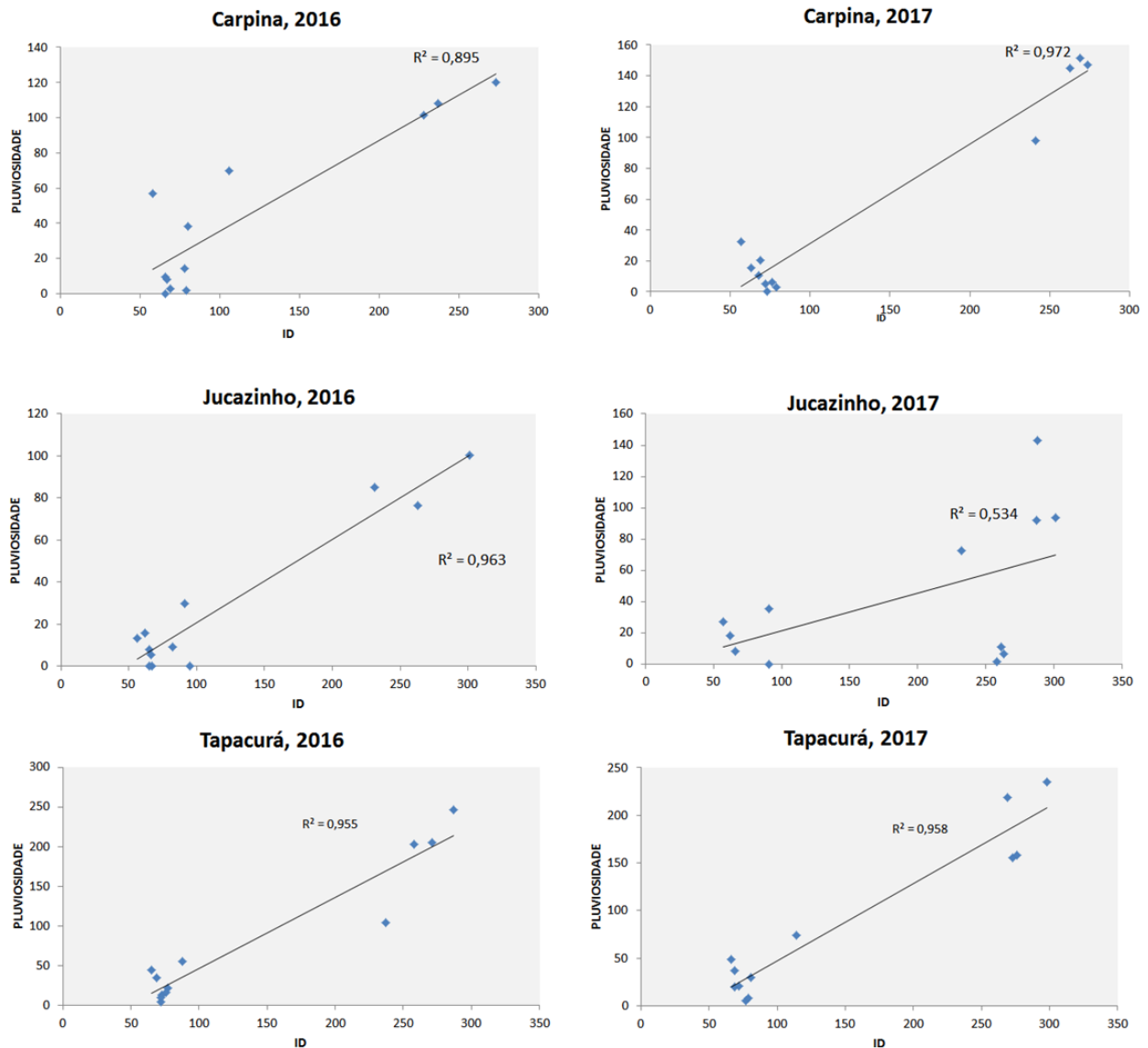
Para análise de correlação foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para as medianas dos dados e relacionados com a pluviosidade local dos períodos investigados. Na barragem de Carpina, em ambos os anos, houve uma correlação positiva entre o ID e a pluviosidade, indicando que o aumento do ID está diretamente relacionado com o aumento da pluviosidade, onde a correlação foi mais acentuada para o ano de 2017. O mesmo foi detectado para barragem de Tapacurá.

Isso significa que, embora a chuva contribua para diluir contaminantes presentes na água, o aumento da pluviosidade pode de igual maneira dispersar esses contaminantes carreando para outras áreas. O escoamento superficial e lixiviação das águas da chuva são uns dos principais processos responsáveis pelo carregamento de pesticidas e outros contaminantes para reservatórios, lagos e rios, expondo os organismos aquáticos a substâncias que podem ser tóxicas a várias espécies (BELCHIOR et al., 2017). BOLOGNESI e HAYASHI (2011) alertam que muitas dessas substâncias têm potencial genotóxico e mutagênico que induzem modificações químicas na molécula de DNA.

Vale ressaltar que, embora a barragem de Jucazinho tenha apresentado uma correlação positiva nos dois anos, no ano de 2017 foi constatada uma correlação moderada, principalmente nos últimos três meses (Fig. 3), possivelmente devido a um processo de eutrofização.

A eutrofização desencadeada em muitos reservatórios artificiais tem despertado a atenção do Poder Público em função do perigo que estas águas oferecem, principalmente quando utilizadas para o abastecimento humano. Deve-se salientar que, em um ambiente eutrofizado, pode proliferar cianobactérias em detrimento de outras espécies aquáticas, as quais podem produzir toxinas que causam sérios danos à vida animal e à saúde humana, podendo até mesmo levar à morte (OLIVEIRA e MOLICA, 2008).

Figura 3: Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e do Índice pluviométrico das barragens de Carpina, Jucazinho e Tapacurá nos anos de 2016 e 2017.

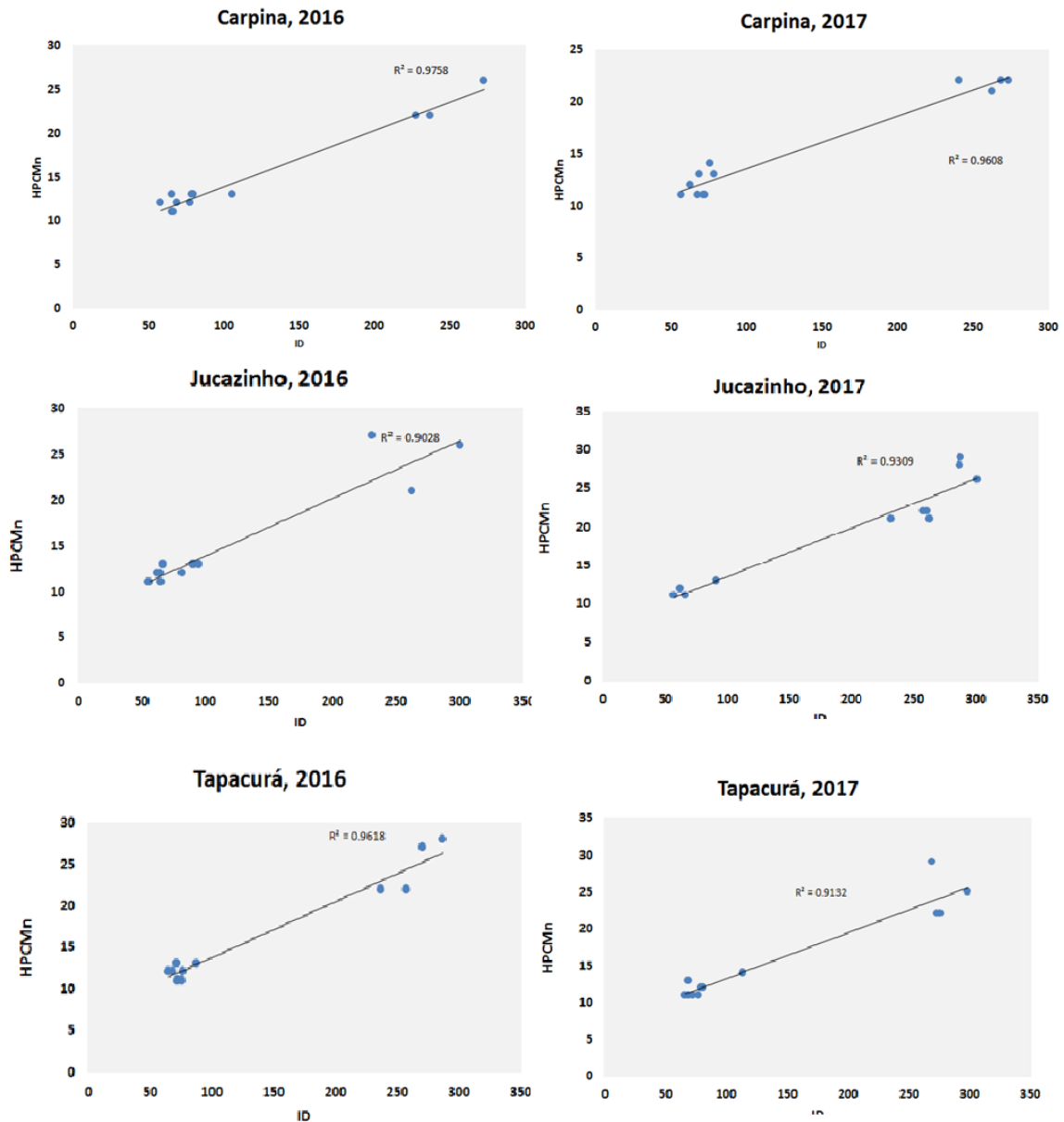


Quando analisado o comportamento mensal do HPCMn e do Índice de Dano ao DNA (ID), verificou-se que ambos se comportam de maneira proporcionalmente similar ao longo do tempo (Fig. 4). Estes resultados revelam o efeito mutagênico que inúmeros contaminantes como metais pesados e pesticidas, por exemplo, podem estar exercendo sobre esses ecossistemas. Estes dados indicam ainda uma forte associação entre altos níveis de macro e microlesões no genoma de *O. niloticus* e a proximidade a regiões intensamente urbanizadas, bem como as atividades turísticas. O turismo tem sido cada vez, mais associado a distúrbios

antrópicos em ecossistemas aquáticos ao longo da costa do nordeste do Brasil, com crescentes liberações de esgoto não tratado nessas áreas (Santos et al., 2015).

De acordo com Lima et al (2018) os pólos industriais presentes nas proximidades do rio Capibaribe também tem exercido forte influência para os altos níveis de degradação ambiental detectados nessas áreas. Em seu estudo, dentre cinco estuários analisados genotoxicamente, o estuário do Rio Capibaribe foi o mais impactado. Estes autores ressaltam que o impacto detectado está associado à vasta região urbanizada que o rio Capibaribe percorre, recebendo efluentes domésticos e industriais. Essa evidência assemelha-se aos resultados genotóxicos observados em outros estudos (Galindo & Moreira, 2009; Maciel et al. 2015), o que comprova o nível significativo do impacto ambiental sofrido nesse ambiente.

Figura 4: Gráfico de dispersão do HPCMn e do Índice de Dano ao DNA da barragem de Carpina, Jucazinho e Tapacurá nos anos de 2016 e 2017



Adicionalmente foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ao nível de 95% de confiança para verificar o ID sofrido mensalmente nas três barragens investigadas (Tabela 1). Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os espécimes coletados nas barragens e o controle negativo em todos os meses investigados durante os dois anos de monitoramento, uma vez que foi obtido p-valor menor que o nível de significância fixado de 5% (0,05).

Entretanto, quando realizada comparação sem o controle negativo apenas em alguns meses foram identificadas diferenças, sobretudo no ano de 2016. Curiosamente, o mês de dezembro apresentou diferenças significativas em ambos os anos, contudo, a intensidade do dano foi bem maior em 2017.

Este é o primeiro relato do biomonitoramento em barragens de abastecimento do rio Capibaribe por meio de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade. Os resultados aqui apresentados são preocupantes e demonstram a necessidade da realização de um monitoramento ambiental contínuo do ambiente investigado a fim de garantir a melhoria da qualidade da água para a população que faz uso desses ambientes.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, C. R.; Araújo, MC; ARAUJO, A. V.; MARCEL, F.; MEDEIROS, A. C.; BEZERRA, R.; BEZERRA JUNIOR, L.; OLIVEIRA, M.B.M. Alterações bioquímicas na tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1757) ocasionadas pela poluição no riacho do cavouco: perspectiva de monitoramento utilizando biomarcadores enzimáticos In: Maria Betania Melo de Oliveira/Rodrigues Gonçalves/Kenia Valença. (Org.). Riacho Cavouco: que Riacho é Esse?. 1ed. Recife: Editora Universitária, p. 33-50, 2014.
- BRAHAM, R.P. Micronuclei and Other Erythrocyte Nuclear Abnormalities in Fishes from the Great Lakes Basin, USA. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. DOI 10.1002/em. 2017.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011
- BELCHIOR, D.C.V et al. Impactos de agrotóxicos sobre o meio Ambiente e a saúde Humana. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 34, n. 1, p. 135-151, jan./abr. 2017
- CONCEIÇÃO, M.B. 2004. Avaliação da genotoxicidade por frequência de Micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas do Rio Itajaí-Açu e Itajaí-Mirim, Santa Catarina-Brasil.
- GALINDO, T.P., MOREIRA, L.M., 2009. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet Mol Biol* 32(2), 394-398.
- HUSSAIN, B. et al. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.048>
- IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014. Estimativas de população por cidades. Available from: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php>.
- JAVEDE, M. et al. Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. *Ecotoxicology and Environmental safety* (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.007>
- LÈVEQUE, C. Out of Africa: the success story of tilapias. *Environmental Biology of Fishes*, v. 64, p.461–464, 2002.
- LIMA, A.R.B et al., Genomic damage in *Mugil curema* (Actinopterygii: Mugilidae) reveals the effects of intense urbanization on estuaries in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 2018.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. *Tilapia aquaculture in the Americas*. World Aquaculture Society, v. 2. p. 133-140, 2000.

MACIEL, D.C., SOUZA, J.R.B., TANIGUCHI, S., BICEGO, M.C., ZANARDI-LAMARDO, E., 2015. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a an urbanized tropical estuary and adjacent shelf, Northeast of Brazil. *Mar Pollut Bull* 101, 429-433.

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. Fundamentos da moderna aquíicultura. 1. ed. ULBRA: Canoas, 2001. 200 p.

OLIVEIRA, M. C. B.; MOLICA, R.. Cianobactéria Invasora- Aspectos Moleculares e Toxicológicos de *Cylindropermopsis Raciborskii* no Brasil. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, edição, n. 30, jan/jun, 2003.

RIBEIRO, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356pp.

SANTOS, G. S., BURGOS, D. C., LIRA, S. M. A., SCHWAMBORN, R., 2015. The impact of trampling on reef macrobenthos in Northeastern Brazil: how effective are current conservation strategies?. *Environ Manag* 56, 847-858.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.

GHISI, N.C., DE OLIVEIRA, E.C., FAVARO, 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. *Bull Environ Contam Toxicol* 93(6), 699-709.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184–191, 1988.

SILVA, J.M et al. Determination of genotoxic effect of trifluralin on *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae, Cuvier, 1816) using a multibiomarker approach. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* v. 12, n. 1, , 85-93 doi: 10.5132/eec.2017

SOUZA, I.C., DUARTE, I.D., PIMENTEL, N.Q., ROCHA, L.D., MOROZESK, M., BONOMO, M.M., 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ Pollut* 180, 136-144.

THOMÉ, R.G.; SILVA, P.M.; SANTOS, H.B. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. *Revista Conexão Ciência* Vol. 11; nº 2; 2016.

WANG. Y., CHEN, C., ZHAO, X., WANG. Q., QIAN. Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 122 (2015) 81–85. 2015.

3.3 ARTIGO 3

ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICA EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS SUBMETIDO A
ESGOTAMENTO SANITÁRIO URBANO

Este artigo será submetido à revista
Ecotoxicology and Environmental Safety
Qualis: B1
ISSN: 0147-6513
Fator de Impacto: 3.743

Corresponding author:

Maria Betânia Melo de Oliveira

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540 Recife, PE, Brasil;

E-mail address: maria.bmoliveira@ufpe.br

ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICA EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS SUBMETIDO A ESGOTAMENTO SANITÁRIO URBANO

Jordany Gomes da Silva^{1,3}; Cristiano Chagas³; Maria Betânia Melo de Oliveira²; Ranilson de Souza Bezerra¹

1-Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

2-Laboratório de Biologia Molecular – BioMol, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

3-Laboratório de Biotecnologia e Fármaco vinculado ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

RESUMO

Estação de tratamento corresponde a um local em que se realiza a purificação da água captada de alguma fonte para torná-la própria para o consumo. O objetivo desse trabalho foi analisar pontos estratégicos do rio Tapacurá por meio de análises ecotoxicológicas (ensaio cometa e testes de micronúcleos) em indivíduos de Tilápia do Nilo (*Oreochomis niloticus*), além de análises físico-químicas da água. Foram investigados os seguintes pontos: município de Vitória de Santo Antão-PE, ponto 1 (P1); Natuba, zona rural do município, ponto 2 (P2) e Estação de Tratamento de Esgoto do município (ETE). As coletas ocorreram mensalmente (01-12) durante o ano de 2017. Para análise físico-química foram considerados os seguintes parâmetros: Temperatura (°C), Turbidez (NTU), Condutividade (µS/cm), Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L) e Oxigênio Dissolvido (mg/L). Como resultado foi observado que os parâmetros Turbidez, Condutividade, Sólidos Totais Dissolvidos estavam em desacordo com os limites máximos recomendados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (resolução nº 357/2005). Os dados ecotoxicológicos revelaram níveis elevados de danificação genômica no DNA de *O. niloticus*, indicando que o ambiente estava impactado. Esses dados são alarmantes, uma vez que o local analisado serve para base alimentar do município e região. Os dados fornecem subsídios para elaboração de programas de gestão socioambiental que visem à melhoria da qualidade da água e seu uso sustentável.

Palavras - Chave: Estação de Tratamento; Monitoramento Ambiental; sustentabilidade; Biomarcador.

INTRODUÇÃO

Em 20 de março de 2015 a ONU apresentou um relatório intitulado “Água para um mundo sustentável”, a intenção era para que existisse um cuidado mundial desse recurso natural, que é fundamental, além de alertarem o declínio de 40% da água potável até 2030 (ONU, 2015). Cada vez mais aumenta os efluentes, os quais são na sua maioria de esgoto doméstico ou industriais. São compostas por água doméstica, excretas dos seres humanos, água dos comércios e também das indústrias. Em 2010 quase 47,8% dos municípios do Brasil não apresentavam rede de esgoto (PEREIRA et al, 2015).

Com a finalidade de tratar a água utilizada, tanto em redes domésticas, quanto em industriais, criou-se as estações de tratamento de efluentes, conhecidas como ETE. De acordo com a Resolução 357, de março de 2005, do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) em seu art.2º, inciso XV, classifica esse sistema como “corpo hídrico superficial que recebe o lançamento de um efluente” (BRASIL, 2005). As ETEs tem como função tratar o esgoto, com o intuito de reintegrá-los na natureza. Esse tipo de tratamento inclui diversas operações que removem as substâncias indesejáveis ou as transformam em outras, com o intuito de torná-las menos perigosas ao meio ambiente.

O objetivo deste trabalho foi analisar pontos estratégicos do rio Tapacurá por meio de análises ecotoxicológicas (ensaio cometa e testes de micronúcleos) em indivíduos de Tilápia do Nilo *Oreochomis niloticus*, além de análises físico-químicas da água.

METODOLOGIA

O rio Tapacurá foi escolhido pela interferência que o mesmo sofre com a região urbanizada do município de Vitória de Santo Antão. As coletas foram feitas mensais no ano de 2017, sempre pelo horário da manhã. Foi requerido espécimes de tilápias juvenis *O. niloticus* dos tanque de controle do departamento de piscicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE para os controles. Nos peixes para controle positivo foi

aplicado 0,3ml de ciclofosfamida. Para o manuseio com peixes nos locais de coleta e nos laboratórios foi pedido o certificado do CEUA-Conselho de Ética no Uso de Animais na comissão de ética animal da Universidade Federal de Pernambuco, com o número de protocolo 004.533/2015. Para a coleta do tecido sanguíneo, o animal foi retirado da água e imediatamente envolvido em um pano de algodão umedecido com água. Logo após, foi feita uma secção da veia caudal para coleta do sangue com auxílio de seringas de insulina previamente heparinizadas para realização dos ensaios genotóxicos. Em seguida foram realizados os procedimentos do ensaio cometa, conforme protocolo de Ostling e Johanson (1984), modificado em 1988 por Singh et al. e revisado por Tice et al. (2000), além do teste de micronúcleo proposto por Schmid (1975).

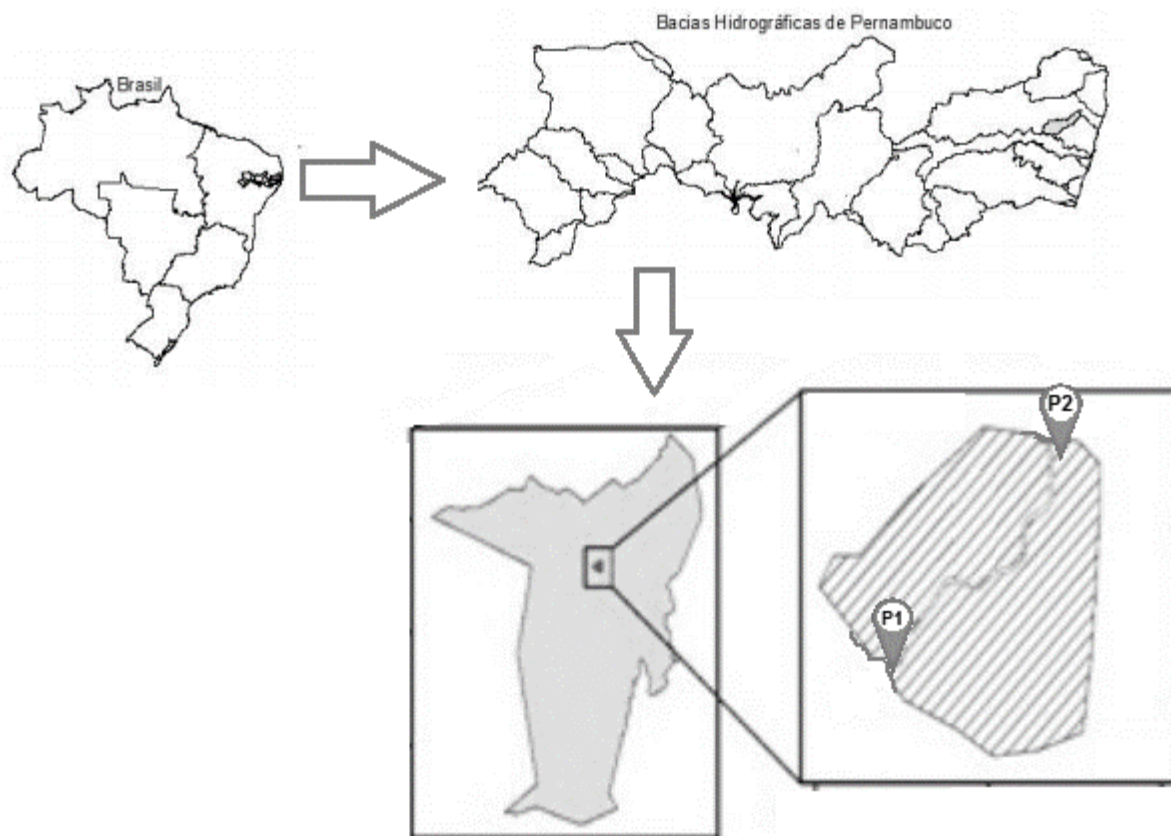
Área de Estudo e Coleta dos Materiais

A bacia hidrográfica do rio Tapacurá conta com doze sub-bacias sendo as principais formada pelos riachos Itapessirica, Natuba, Gameleira e Várzea do Una e abrange seis municípios, sendo Vitória de Santo Antão o mais representativo. Esta bacia esta localizada entre as coordenadas 35° 30' 00" e 35° 5' 00" de longitude oeste e 8° 13' 00" e 7° 58'30" de latitude sul. O trecho superior do rio começa no município de Gravatá (390 m em relação ao nível do mar) e o curso médio termina alcançando o reservatório de Tapacurá. A jusante da barragem, o rio Tapacurá deságua no rio Capibaribe no município de São Lourenço da Mata, do qual é o principal afluente (Figura 01).

Foram escolhidos dois pontos de coleta ao longo do rio Tapacurá no município de Vitória de Santo Antão-PE. Esses pontos foram escolhidos devido às características de interação. Ponto 1 (P1) – Ponte de Natuba, zona rural do município, Ponto 2 (P2) Estação de Tratamento de Esgoto do município (ETE). As coletas ocorreram mensalmente (01-12) no de 2017.

Nesse estudo foram determinados, analiticamente, os parâmetros físico-químicos: Temperatura (°C), Turbidez (NTU), Condutividade (µS/cm), Sólidos Totais Dissolvidos (mg/l) e Oxigênio Dissolvido (mg/l) da água por meio de um aparelho multiparâmetro. Para análise de genotoxicidade e mutagenicidade foram coletados 15 indivíduos da espécie *O. niloticus* e transportados para o laboratório de Biotecnologia de UFPE/CAV.

Figura 01. Mapa de localização dos pontos de monitoramento (coleta) do trecho estudado no Rio Tapacurá em Vitória de Santo Antão- Pernambuco (P1- Natuba e P2 estação de tratamento de Vitória de Santo Antão).



Ensaio de Genotoxidade e Mutagenicidade

O ensaio cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Singh et al. (1988) com algumas adaptações. Utiliza-se lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. Depois coloca-se o sangue retirado do indivíduo por punção caudal com seringas heparinizadas. Todo processo depois da coleta de sangue deve ser executado em uma sala com luz vermelha, tendo em vista que o experimento é fotossensível. Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas para o refrigerador (temperatura de 4 °C) por 10 minutos. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram depositadas em cubas com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após 48 horas na lise, as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200

mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de ± 300 mA e diferença de potencial de 32V. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. Para revelação, cada lâmina foi corada com 30 μ L de solução de brometo de etídio (0, 0002%, p/v). A avaliação foi feita em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Foram analisados 100 nucleóides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleóide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo).

Teste de Micronúcleo (MN)

Para utilização das lâminas foi preciso lavar com detergente neutro e água destilada, depois foram banhadas em álcool 70% e depositadas em estufa (80 °C) por 15 minutos. Ainda aquecidas, espalhou-se uniformemente 10 μ L de laranja de acridina (1mg/ml) em cada lâmina e posteriormente colocadas para secar em temperatura ambiente por um tempo mínimo de 30 minutos (EIJ et al., 1992). O sangue de cada animal foi colocado em lâmina com o corante de laranja de acridina e, em seguida foi coberto com uma lamínula para espalhar uniformemente o material biológico.

Para os ensaios de MN foram utilizados a contagem de 4000 células por indivíduo para se quantificar a presença de células micronucleadas (OCDE, 2014). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software R (R Core Team, 2015) e IBM SPSS Statistics versão 20. Medidas descritivas das principais variáveis do estudo foram analisadas e seu comportamento foi observado através do boxplots dos dados. As análises foram realizadas de acordo com a mediana, pois os valores apresentados eram assimétricos não sendo representados pela média.

Para o teste cometa foram utilizados dois parâmetros distintos: O índice de dano (ID), calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o número referente ao nível de dano e, a frequência do dano (FD); calculada como a porcentagem de todos os cometas em relação ao número total de células avaliadas. Para tanto, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para k amostras independentes, quando a variância não foi homogênea ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSAO

Analise Físico-química da água

A tabela 01 mostra o resultado das análises físico-químicas dos diferentes pontos investigados. O P1 apresentou nos meses de maior pluviosidade (abril, maio, junho e julho) valores divergentes dos estabelecidos pelo CONAMA 357/05. Os parâmetros em desacordo foram: Turbidez (NTU) acima de 100NTU, Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L) acima de 500 mg/L.

Já no P2 foram observados em desacordo os seguintes parâmetros: Turbidez (NTU), Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L) durante todos os meses do ano. O Oxigênio dissolvido só ficou no valor aceitável nos meses de maior pluviosidade (Abril, Maio, Junho e Julho).

PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICO DO PONTO 1

Parâmetros Analisados	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Temperatura (C°)	28	29	25	28	29	26	28	29	30	28	31	29
Turbidez (NTU)	87	32	50	110*	121*	123*	130*	87	45	35	65	60
Condutividade (µS/cm)	65	57	67	190*	300*	300*	120*	76	69	87	89	79
Sólidos Totais	340	400	290	750*	720*	900*	910*	320	300	250	235	233
Dissolvidos (mg/L)												
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,3	6,5	7	6	6	7	5	6,2	6	7,8	5	5,5

PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICO DO PONTO 2

Parâmetros Analisados	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Temperatura (C°)	33	35	25	30	27	28	29	33	34	32	33	32
Turbidez (NTU)	102*	114*	119*	109*	110*	139*	149*	114*	115*	102*	107*	102*
Condutividade (µS/cm)	1100*	950*	200*	350*	300*	390*	180*	1290*	1420*	950*	1000*	950*
Sólidos Totais	690*	720*	650*	900*	1001*	1010*	990*	620*	610*	700*	620*	600*
Dissolvidos (mg/L)												
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	3*	3,1*	4,8*	6	5	5	5,2	3,5*	4*	4*	3,5*	4*

Tabela 01: Análise físico-química do Ponto 1 (P1) e Ponto 2 (P2) estratégicos do rio Capibaribe durante o ano de 2017

*Valores que estão em desacordo com o CONAMA 357/2005

Figura 02: Correlação da Frequência de Danos (ID) e pluviosidade do (P1) e (P2) durante o ano de 2017.

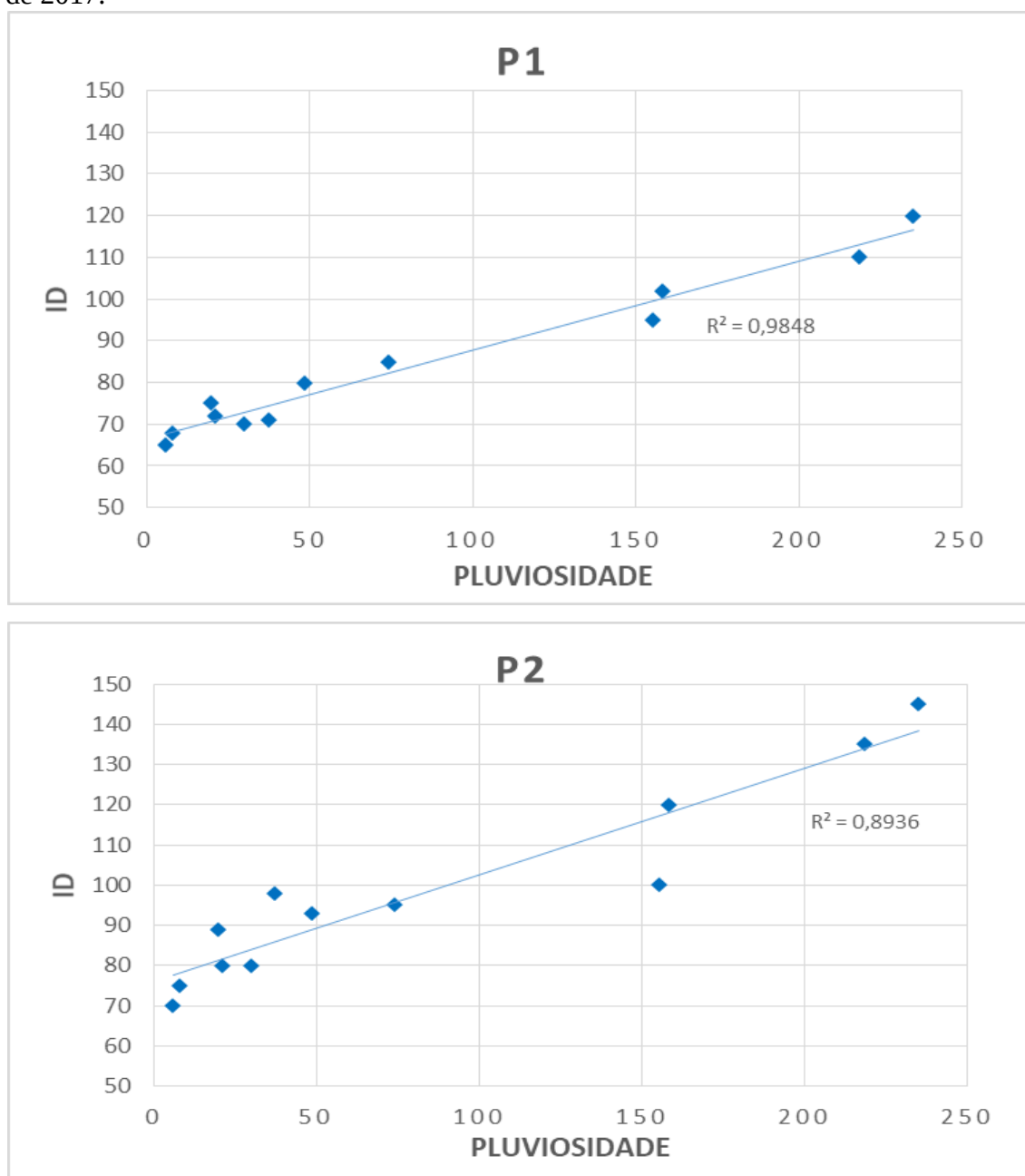


Figura 03. Relação de frequência de dano, índice de dano e pluviosidade.

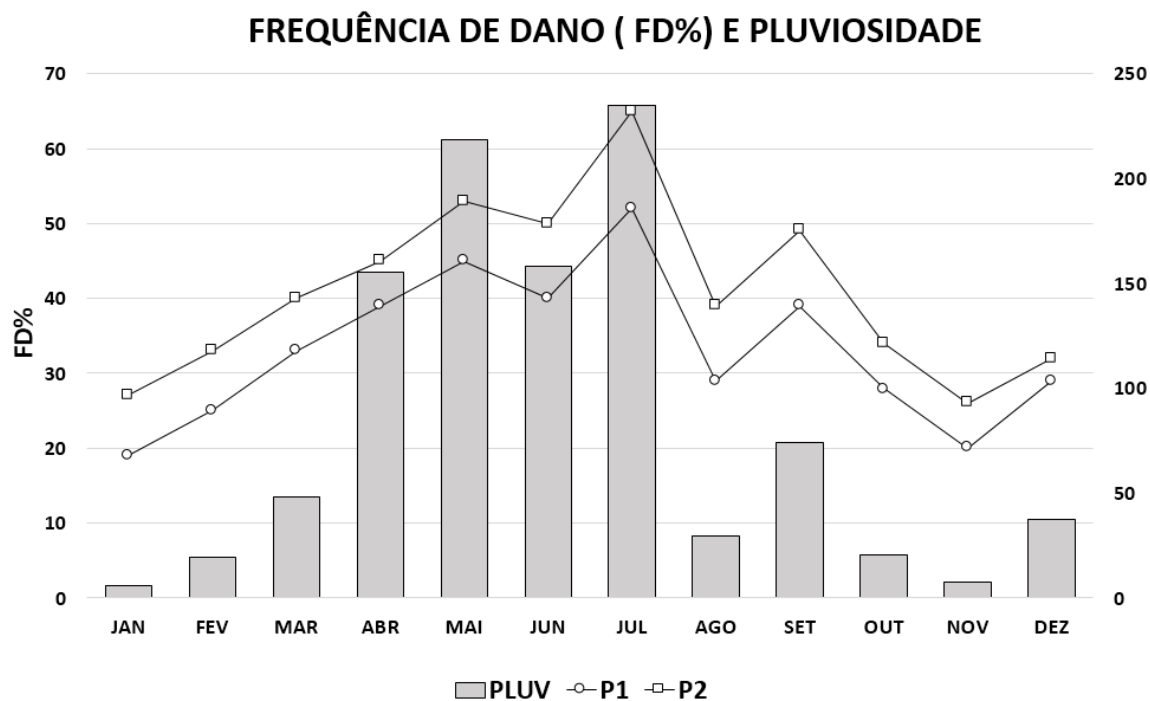
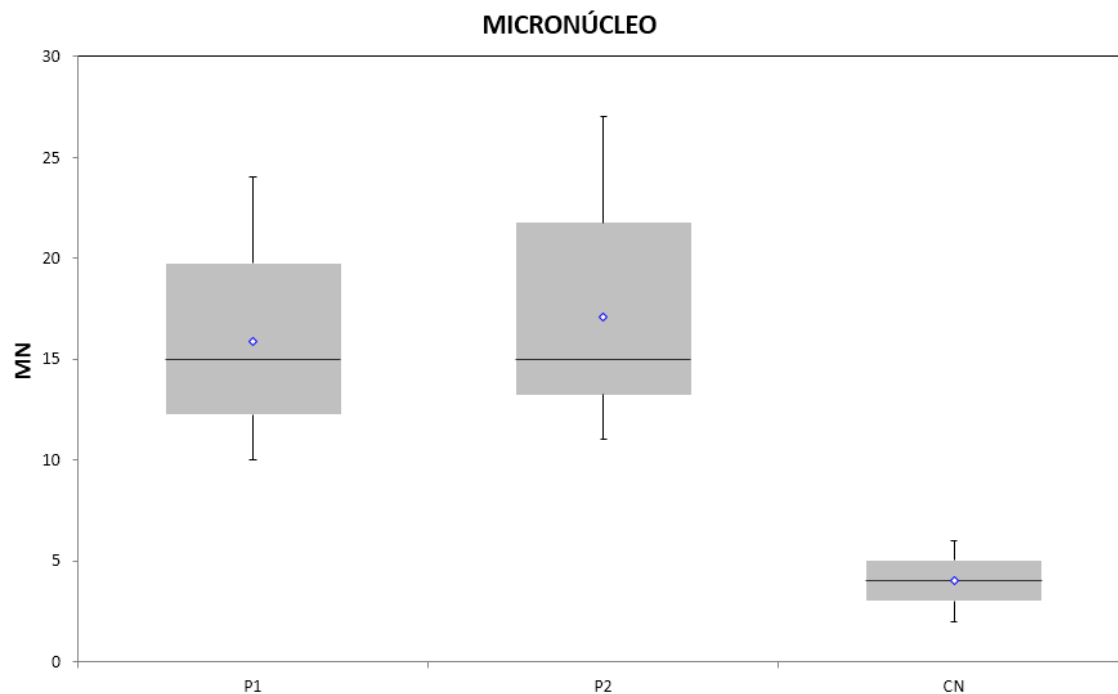


Figura 04. Micronúcleo.



Os valores do micronúcleo não tiveram valor significativo com o controle normal. Dando um valor de $P=0,7935374$ (P 1) e $0,72697574$ no (P2).

CONCLUSÃO

Com as análises foi observado elevados níveis de danificação genômica no DNA de *O. niloticus*, indicando nos ambientes, sendo o P2 o ponto que mais sofre com a agressão ambiental. Tendo em vista que muitos utilizam o local para base alimentar familiar e até comercial da cidade e região isso desperta uma grande preocupação com a saúde humana e o meio ambiente. O P1 está em desacordo nos meses de maior pluviosidade, fenômeno que pode estar agregado a (abril, maio, junho e julho) valores divergentes dos estabelecidos pelo CONAMA 357/05. Os parâmetros em desacordo foram: Turbidez (NTU) acima de 100NTU, Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L) acima de 500 mg/L. Levando em conta o P2, percebeu desacordos dos seguintes parâmetros: Turbidez (NTU), Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L) durante todos os meses do ano. O Oxigênio dissolvido só ficou no valor aceitável nos meses de maior pluviosidade (Abril, Maio, Junho e Julho). O frequência de dano ao DNA foi significativa e sua correlação foi constada nos pontos de estudo. Onde o P1 teve um $R^2 = 0,9848$ e P2 um $R^2 = 0,8936$ todos dois considerando uma correlação forte. Isso significa que com o aumento da pluviosidade existe um aumento da frequência de dano genético. Quando analisado o micronúcleo, o qual é um dano estocástico, podemos perceber que o P2 teve uma quantidade mais elevado que o P1. Todos os dois pontos apresentaram danos genético significativos com a comparação do grupo controle. Os resultados apresentados confirmam o impactado a nível físico-químico, genotóxico e mutagênico, como resultado do descarte inadequado de resíduos local dificultando a qualidade da água e manutenção de vida aquática. Essas informações poderão servir de subsídio à tomada de decisão pelos órgãos ambientais regionais responsáveis pela gestão dos recursos hídricos, uma vez que os resultados auxiliam a traçar um perfil de conservação e assim gerar melhorias para resgatar a qualidade da água e vida do “Capibaribe”.

REFERÊNCIAS

- BENEDETTI, E. Água- Fonte da vida- Considerações. Veterinária Notícias, Uberlândia, v. 18, n. 1, p. 1-5, jan./jun. 2013.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 Março de 2005. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 13 de abr. 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de Março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 05 de mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2914 de 12 de Dezembro de 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 05 de mar. 2018.

CARMO, R. L et al. População e consumo urbano de água no Brasil: interfaces e desafios. Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. 2013.

COSTA, C. M. S. et al. Controle da Poluição da Água em Maceió. Cadernos de Graduação, Maceió, v. 1, n.1, p. 41-50, mai. 2014

DOS SANTOS, D. J. et al. Análise físico-química e microbiológica da água de poços superficiais, caixas d'água e do sistema de tratamento, em residências no município de Nova Xavantina-MT. Revista Eletrônica Interdisciplinar, v. 1, n. 13, p. 31-6. 2015.

DUARTE, G. W. et al. Aproveitamento de Água Pluvial para Fins não Potáveis: estudo de caso na jardinagem. Revista Ciência & Cidadania, v. 1, n. 1, p. 8-18. 2015.

FERREIRA, M. G. Análise da variabilidade da precipitação e da estiagem no município de Erechim e Região Norte do Rio Grande do Sul. 2014. 45 f. Monografia (Bacharel em Geografia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul- RS.

JAWETZ M. J, M. J. L.; ADELBERG E. A. Microbiologia Médica. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

LIRA, R. M. et al. A utilização de águas de qualidade inferior na agricultura irrigada| The use of lower quality water in irrigated agriculture. Revista Geama, Recife, v. 2, n. 2, p. 95-128, dez. 2015.

PEREIRA, A.A.S. et al. Avaliação da qualidade da água do Ribeirão São João, em Campo Belo Minas Gerais, sob interferência do efluente tratado do abate de bovinos e suínos. Natureza on line, Ribeirão São João, p. 101-105, nov./abr. 2015.

ONU. Até 2030 planeta pode enfrentar déficit de água de até 40%, alerta relatório da ONU. Disponível em: Acesso: 03 mar. 2015

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados confirmam a hipótese de que o rio Capibaribe está sofrendo impacto ambiental a nível físico-químico, genotóxico e mutagênico. O rio é local escolhidos por muitos para descarte inadequado de resíduos provenientes da indústria têxtil, esgotos dos centros urbanos, esgotos industriais, hospitalares e da agricultura local prejudicando a qualidade da água e manutenção de vida aquática. Com estas informações os órgãos governamentais e privados terão subsídio à tomada de decisão. Este é o primeiro relato do biomonitoramento em barragens de abastecimento do rio Capibaribe por meio de ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade. Os resultados aqui apresentados são preocupantes e demonstram a necessidade da realização de um monitoramento ambiental contínuo do ambiente investigado a fim de garantir a melhoria da qualidade da água para a população que faz uso desses ambientes. Em nossas análises podemos concluir que todo trecho do rio se encontra impactado, porém locais de liberação de resíduos têxtil e esgotamento sanitário são os mais impactados. Os resultados observados servem para alertar a população, os órgãos competentes e os de gestão sobre os impactos causados no ambiente e na saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ACQUA-PLAN. Capibaribe: Como Domesticar um Rio. Brasília. Min. Interior. v.2, n. 11, p. 8. 1976.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de ingrediente ativo. 2003. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de fevereiro.
- AKTAR, M. W. et al. Degradation dynamics of an oxime carbamate insecticide (methomyl) in aqueous medium of varying pH under laboratory simulated condition. *Orbital-The Electronic Journal of Chemistry*, v. 2, n. 3, p. 225-234, 2011.
- AKYIL, D.; KONUK, M. Detection of genotoxicity and mutagenicity of chlorthiophos using micronucleus, chromosome aberration, sister chromatid exchange, and Ames tests. *Environmental toxicology*, v. 30, n. 8, p. 937-945, 2015.
- AL-SABTI, Khalid. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 85, p.5-9, 1986.
- ALVES-COSTA, J. R. M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. 2001. 125f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- ALIMENTARIUS, C. Pesticide Residues in Food: Methods of Analysis and Sampling, part 1. CODEX ALIMENTARIUS, Roma, 2000.
- ALVES, A. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Consumo: usos e abusos. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 49-52, 1986.
- AMARAL, A. F. Pesticides and asthma: challenges for epidemiology. *Frontiers in public health*, v. 2, 2014.
- AMES, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, v. 204, n. 4393, p. 587-593, 1979.
- ANDEF, A. N. D. D. V. Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. *Revista Defesa Vegetal*, 2009.
- AOYAMA, K.; IWAHORI, K.; MIYATA, N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutation Research*. v. 538 p.155-162. 2003.
- 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 Aliğa Bay Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 94: 48-54.
- ABIT – Associação Brasileira da Indústria Têxtil. Disponível em: . Acesso em 08 nov. 2016.

ARAVIND, P.; SELVARAJ, H.; FERRO, S.; SUNDARAM, M. Na integrated (electro- and bio-oxidation) approach for remediation of industrial wastewater containing azo-dyes: Understanding the degradation mechanism and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Material*, v. 318, p. 203-215, 2016.

ATIENZAR, F.A.; JHA, A.N. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research*. v.613, p.76-102, 2006.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 145, p. 282-287, 2007.

ATSDR (Agency for Toxic Substance and Disease Registry), 2005. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centres for Diseases Control, Atlanta, GA. In:

BATISTA, C. R.; CAMPOS, E. O. Avaliação da genotoxicidade em células de pacientes fumantes e não fumantes por meio do teste do micronúcleo. *Revista GeTeC*, v. 3, n. 6, 2015. ISSN 2238-4405.

BEDOR, C. N. G. Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde. 2008.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS. M. Cytogenetic studies of PCB on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v.11, p.485-492, 1996.

BOECK, M; VOLDERS, K.M. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) Is Not an Adequate Sentinel Species To Assess the Genotoxic Risk (Comet Assay) of AH Exposure to the Environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. v. 30, p. 82-90. 1997.

BHUNYA, S.; PATI, P. Genotoxic effects of a synthetic pyrethroid insecticide, cypermethrin, in mice in vivo. *Toxicology letters*, v. 41, n. 3, p. 223-230, 1988. ISSN 0378-4274.

BURKINSHAW, S.; SALIHU, G. The wash-off of dyeing using interstitial water Part 4: disperse and reactive dye on polyester/cotton fabric. *Dyes and Pigments*, v. 99, p. 548-560, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Nº430/2011- “Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA” – Publicação DOU nº 92, de 16/05/2011, 2011. 89p. BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, 1997. Disponível em: < <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 20 de fevereiro.

BRASIL; ABASTECIMENTO, M. D. A. E. D. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989: Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino

final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Legislação federal de agrotóxicos e afins, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada: Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos. Brasília, 2006.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, n. 4, p. 182-187, 2000. ISSN 0924-2244.

BERGMAYER HU. *Methods of enzymatic analysis*, 3.ed., Weinheim: Verlag Chemie Publishers; 1984. p.141-148.

BUCKER, A.; CARVALHO, W., ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amaz.* 36, n. 3, p. 357-364. 2006.

BULL, D.; HATHAWAY, D. *Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo*. 1986.

CALDAS, E.; DE SOUZA, L. [Assessment of the chronic risk for ingestion of pesticide residues in the Brazilian diet]. *Revista de saúde pública*, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000. ISSN 0034-8910.

CAMAROTTO, J. A. C., D. M.; BRASIL, F.; *Riscos no setor, alimentação e trabalho rural: A saúde do trabalhador rural e o risco invisível dos agrotóxicos* 2004. Engenharia de Produção Química.

CASTRO-GONZÁLEZ, M.I.; MÉNDEZ-ARMENTA, M., Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008, doi:10.1016/j.etap.2008.06.001.

FERRARO, M.V. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 103-107, 2004.

CAPELA, F. S. 2001. Avaliação de biomarcadores. Dept. de Biologia, Universidade de Évora.

CARNEIRO, F. F. et al. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. 2015.

CARON-BEAUDOIN, É.; DENISON, M. S.; SANDERSON, J. T. Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (CYP19) in human adrenocortical carcinoma (H295R) and primary umbilical vein endothelial (HUVEC) cells. *Toxicological Sciences*, v. 149, n. 1, p. 134-144, 2016. ISSN 1096-6080.

CARRARO, G. Agrotóxico e meio ambiente: uma proposta de ensino de ciências e química. Porto Alegre: Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

CARVALHO, M.B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e de orofaringe. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.48, n.4, p.317-322, 2002.

CARVALHO, P. H. V. D. Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em plantas medicinais *Cordia salicifolia* por GC/MS e HPLC/UV empregando dispersão da matriz em fase sólida. 68 p. Dissertação- Universidade Federal do Sergipe. Sergipe 2009.

CASTILLO-CADENA, J. et al. Determination of DNA damage in floriculturists exposed to mixtures of pesticides. *BioMed Research International*, v. 2006, 2006. ISSN 1110-7243.

CHADA FILHO, L. G. Hydrology of the Upper Capibaribe basin Pernambuco, Brasil – A Reconnaissance in area of Cristallino Rocks. Washington, Department of the Interior, 44p. (Geological Survey Water Supply Paper 1663E). 1969.

CHEN, Z.-M.; WANG, Y.-H. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v. 754, n. 1, p. 367-395, 1996. ISSN 0021-9673.

CHOY, W. N. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, p. 47-72, 2001.

CLAXTON, L.D.; HOUCK, V.S.; HUGLES, T.J. Genotoxicity of industrial wasted and effluents. *Mutat. Res.* 410, p. 237-243, 1998.

COTELLE, S; FERARD, J.F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A review. *Enviromental and Molecular Mutageneses*, v. 34, p. 246-255. 1999

CO-OPERATION, O. F. E.; DEVELOPMENT. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing, 2014. ISBN 9264224173.

COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 759, p. 27- 39, 2014. ISSN 1383-5742.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008. ISSN 0267-8357.

COX, M.; LEHNINGER, N. D. Principios de bioquímica. São Paulo, 2006.

CPRH, 2008. Monitoramento das Bacias - Capibaribe. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br>. Acesso em: maio/jun. 2014.

CPRH, 1999. Diagnóstico sócio-ambiental e ZEEC – Zoneamento Ecológico Econômico Costeiro Litoral sul de Pernambuco. Recife, CPRH.

CUNNINGHAM, M. L.; MATTHEWS, H. Cell proliferation as a determining factor for the carcinogenicity of chemicals: studies with mutagenic carcinogens and mutagenic noncarcinogens. *Toxicology letters*, v. 82, p. 9-14, 1995. ISSN 0378-4274.

DALLAGO, R. M.; SMANIOTTO, A.; OLIVEIRA, L. C. A. Resíduos sólidos de curtumes como absorventes para remoção de corantes em meio aquoso. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 433-437, 2005.

DA COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Projeto Genoma do Câncer*, p. 24, 2000.

DA SILVA AUGUSTO, L. G. et al. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 29, n. 1, p. 46-52, 1997. ISSN 1098-2280.

DA SILVA FILHO, J. et al. Intoxicação alimentar provocada por consumo de tapiocas contaminadas com carbamato em Sobral, Ceará, Brasil. *SANARE-Revista de Políticas Públicas*, v. 7, n. 1, 2008a. ISSN 2317-7748. Intoxicação alimentar provocada por consumo de tapiocas contaminadas com carbamato em sobral, ceará, brasil. *SANARE-Revista de Políticas Públicas*, v. 7, n. 1, 2008b. ISSN 2317-7748.

DA SILVA, J. M. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciênc Saúde Coletiva*, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 134, n. 1, p. 109-121, 2003. ISSN 1532-0456.

DE SOUZA, A. P. et al. Genotoxicidade associada ao extrato das folhas de *Cynara scolymus* L. em células humanas HepG2. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, v. 1, n. 11, 2013. ISSN 2317-4323.

DE SOUZA MENDONÇA, F. et al. Intoxicação por diclorvós e cipermetrina em bovinos em Mato Grosso—relato de caso. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 3, p. 743-749, 2010.

DE SOUZA OLIVEIRA, S. O papel da avaliação de riscos no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formulação de políticas públicas. 2005. Universidade de São Paulo.

DELLA LUCIA, T.; CHANDLER, L. Tabela de vida das culturas aplicada as pragas de *Phaseolus vulgaris* L., sob tratamentos com carbofuram, em quatro níveis de adubação NPK. Parte de tese. *Revista Ceres*, 1985. ISSN 0034-737X.

DILARRI, G.; DE ALMEIDA, É. J. R.; PECORA, H. B.; CORSO, C. R. Removal of Dye Toxicity from an Aqueous Solution Using an Industrial Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* (Meyen). *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 227, p. 269, 2016.

DOMINGUES, M. R. et al. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2004.

EIJI, Y. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 278, n. 2, p. 127-130, 1992. ISSN 0165-1218.

ERGENE, S. et al. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment international*, v. 33, n. 7, p. 877-885, 2007.

FALCK, G. C. M. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research/Genetic toxicology and environmental Mutagenesis*, v. 441, n. 2, p. 225- 237, 1999. ISSN 1383-5718.

FARRÉ, M. et al. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 373, n. 8, p. 704-709, 2002. ISSN 1618-2642.
FARIA, T.; PAULA, R.A. de O. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em unidades de alimentação escolar. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*, v. 10, n. 1, p. 135-144, 2013

FALAVINHA, G.; DEGENHARDT, R. Qualidade Microbiológica da água de nascentes e poços da comunidade de Barro Branco, Capinzal, SC. *Unoesc & Ciência, Joaçaba*, v. 5, n. 2, p. 209-216, 2014.

FAUST, F. et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 566, n. 3, p. 209-229, 2004. ISSN 1383-5742.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000. ISSN 0027-5107. .
Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007. ISSN 1754-2189.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 125- 132, 2011. ISSN 0267-8357.

FIDEM. 1987. Proteção das áreas estuarinas. Recife. (Séries Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente).

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009..

FONTENELE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecologia australis*, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.

GAIVÃO, I.; SIERRA, L. M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights, p. 13, 2015.

GALERA, M. M. et al. Determination of cypermethrin, fenvalerate and cis-and trans-permethrin in soil and groundwater by high-performance liquid chromatography using partial least-squares regression. *Journal of Chromatography A*, v. 727, n. 1, p. 39-46, 1996.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*, v. 165, n. 2, p. 153-162, 2001.

GARCIA, E. G. Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. In: (Ed.). *Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos*: Fundacentro, 2001.

GARRETT, N. et al. Genotoxic and carcinogenic potential of anticholinesterases. BUTTERWORTH-HEINEMANN, STONEHAM, MA(USA). 1992.

GATEHOUSE, D. et al. Bacterial mutation assays. *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part*, v. 1, p. 13-61, 1990.

GODSCHALK, R. W. et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 757, n. 1, p. 60-67, 2013.

GONÇALVES, C. D. P. Avaliação dos danos genotóxicos ao DNA de camundongos expostos a hortaliças cultivadas sobre depósitos controlados de rejeitos de carvão. 54p. CRICIÚMA 2013.

GONÇALVES, M. W. et al. Avaliação de Danos Genômicos em Anfíbios Anuros do Cerrado Goiano. *Estudos*, v. 41, p. 89-104, 2015.

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

GOULART, M. D. C; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da Fapam*, v. 2, n. 2, p. 153-164, 2003.

GHAZI MOKRI, H. S.; MODIRSHAHLA, N.; BEHNAJADY, M. A.; VAHID, B. Adsorption of C.I. Acid Red 97 dye from aqueous solution onto walnut shell: kinetics, thermodynamics parameters, isotherms. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 12, p. 1401-1408, 2015

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: Universidade de Brasília, 2005.

GUANGGANG, X. et al. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food and Chemical Toxicology*, v. 53, p. 352-358, 2013.

HARTMANN, A. et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 39, n. 8, p. 843-858, 2001.

HAYASHI, M. et al. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

HAYES, W. J.; LAWS, E. R. Handbook of pesticide toxicology. In: (Ed.). Handbook of pesticide toxicology: Academic Press, 1991.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HORVAT, A. J. M.; PETROVIC, M.; BABIC, S.; PAVLOVIC, D. M.; ASPERGER, D.; PELKO, S.; MANCE, A. D.; KASTELAN-MACAN, M. Analysis, occurrence and fate anthelmintcs and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 31, p. 61-24, 2012.

HILL, A. Residue variability and sampling practical problems and consequences for residues monitoring. *Food Additives & Contaminants*, v. 17, n. 7, p. 539-546, 2000.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research*, v. 104, p.147–152, 1982.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. *Mutat. Res.* 277, n.2, p. 91-138, 1992.

ISLAN, M.S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, v. 48, p.624-649. 2004.

IBAMA. Portaria Normativa IBAMA N° 84. 1996. Disponível em: < servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf >. Acesso em: 15 de fevereiro.

IBGE, indicadores de desenvolvimento sustentável. IBGE (Fundação Instituto Brasileira de Geografia e Estatística) / Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais [e] Coordenação de Geografia. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

JACOBSEN, H. et al. Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. *Food and chemical toxicology*, v. 42, n. 8, p. 1269-1277, 2004.

JAENSSON, A. et al. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquatic toxicology*, v. 81, n. 1, p. 1-9, 2007.

JHA,N.A.; CANTY,N.M.; HUTCHINSON,H.T. & BROWNJ.R;JONES,M,B. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, v. 94, p. 68-76. 2009.

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research*, v. 410, p.123-140, 1998.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 251, n. 15-16, p. 1951-1972, 2007.

KLIGERMAN A. D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In:HEDDLE J. A. (ed). *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. 435-456. Academic Press. 1982.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, p. 43-64, 2003.

LALNUNHLIMI, S.; KRISHNASWAMY, V. Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 39-46, 2016.

LAMSON, D. W. & PLAZA, S. M. 2002. The Safety and Efficacy of High-Dose Chromium. In: *Alternative Medicine Review*, 7, pp. 218-235.

LUCCHESI, G. Agrotóxicos–construção da legislação. Brasília, DF: Consultoria Legislativa, 2005.

LOHMANN, T.H.O. Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método do micronúcleo. São Paulo – SP, 1995, 83p Dissertação de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.

LUZ, N. B. S., H. P.; MELO, G. W. . Avaliação da resposta spectral de folhas de aveia preta (*Avena strigosa*) cultivadas em diferentes solos da Serra Gaúcha, com adição de cobre e material orgânico.In: *Anais do SBSR*, 2003.

MACHEMER, L. H.; PICKEL, M. Carbamate insecticides. *Toxicology*, v. 91, n. 1, p. 29-36, 1994.

MAHGOUB, A. A.; EL-MEDANY, A. H. Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. *Pharmacological Research*, v. 44, n. 2, p. 73-80, 2001.

MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.

MATOS, G. B.; SANTANA, O. A. M. D.; NOBRE, L. C. D. C. Intoxicação por agrotóxico. In: (Ed.). *Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador*: Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador, 2002. p.249- 280.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L. & CAIRNS Jr., J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. *Water Research*, 16:129-139, 1982.

MATTOS, A. R. Açúcar e álcool no Brasil. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1942.. MEDEIROS, G.C.P.L. Avaliação das concentrações de nitrogênio total, orgânico e inorgânico na fração dissolvida como parâmetros indicadores da qualidade da água na região estuarina do rio Capibaribe, Recife- Pernambuco. 2007. 36f. Monografia (Graduação em Ciências Ambientais) - CCB, Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

MENEGUETTI, D. U. D. O.; FACUNDO, V. A. Análise genotóxica e antiparasitária de extratos e substâncias isoladas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (Celastraceae), Chichuá (Xixuá) amazônico. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 6, n. 4, p. 69-70, 2015.

MEYER, A. et al. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental research*, v. 93, n. 3, p. 264-271, 2003. ISSN 0013-9351.

MIDIO, A. F.; SILVA, E. S. D. *Inseticidas-acaricidas organofosforados e carbamatos*. Roca, 1995.

MITCHELMORE, C.; CHIPMAN, J. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998. ISSN 0027-5107.

MONTANHA, F. et al. Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 3, p. 697-704, 2014. ISSN 0102-0935.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 345, n. 3-4, p. 97-103. 1995.

MOREIRA-NETO, J. F. M. N.; NETO, J. M. Teste de micronúcleo e esterases como biomarcadores dos efeitos genotóxicos da cipermetrina. *Horizonte Científico*, v. 3, n. 2, 2010. ISSN 1808-3064.

MORON, S. E. et al. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. *J Braz Soc Ecotox*, v. 1, n. 1, p. 27-30, 2006.

MOURA, A. O. Síntese e aplicação de Magadiíta na liberação controlada de herbicidas. 2008.126 f. Química Inorgânica, Instituto de Química-UnB, Brasília, 2008.

MOURA, D. C. D.; RIEGER, A.; ALCAYAGA, E. A. L. Utilização do ensaio cometa com *daphnia magna* (STRAUS, 1820) como organismo bioindicador para a avaliação da qualidade da água das nascentes do arroio andreas, rs, brasil. *Seminário de Iniciação Científica*, p. 25, 2015.

MOZETO, A.; ZAGATTO, P. Ecotoxicologia aquática—princípios e aplicações. ZAGATTO, PA. and BERTOLETTI, E. Introdução de agentes químicos no ambiente. São Carlos: Rima Editora, p. 15-38, 2006.

MUCHUT, S. et al. Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa). *FABICIB*, v. 15, n. 1, p. 108-118, 2011.

MUKHOPADHYAY, I. et al. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004. ISSN 0267-8357.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 504, n. 1, p. 3-16, 2002.

NETO, J.J.S. Avaliação das condições ambientais do Estuário do Rio Capibaribe baseada no estudo da distribuição sazonal do fósforo. 2008. 50f. Monografia. (Bacharelado em Ciências Biológicas/modalidade Ciências Ambientais) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.

OBE, M.G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHHANES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, Amsterdam, v.504, p.17-36, 2002.

OCDE. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 2014. Disponível em: < <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1455135783&id=id&accname=guest&checksum=FAA3E240036470DE7F48522BC3B7FFFA> >.

OSTLING, O. & JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.123,p. 291–298,1984.

ONO EA. Formação de preço das rações comerciais para peixes. pg 172-187. In: Cyrino JEP, Miyada VS, Menten JFM. *Anais do Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes*, 2..., 1998. Campinas, SP. *Anais...Campinas, SP: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. CBNA*, 1998. 110p

PADILLA, S. et al. Time course of cholinesterase inhibition in adult rats treated acutely with carbaryl, carbofuran, formetanate, methomyl, methiocarb, oxamyl or propoxur. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 219, n. 2, p. 202-209, 2007. ISSN 0041-008X.

PAIVA, Andréa CG de; CHAVES, Paulo de Tarso da C.; ARAÚJO, Maria E. de. Estrutura e organização trófica da ictiofauna de águas rasas em um estuário tropical. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 25, n. 4, p. 647-661, 2008.

PARRON, L. M.; MUNIZ, D. H. F.; PEREIRA, C. M. *Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água*. Colombo-PR, Embrapa Florestas, 2011.

PASCUAL, J. A.; PERIS, S. J. Effects of forest spraying with two application rates of cypermethrin on food supply and on breeding success of the blue tit (*Parus caeruleus*). *Environmental toxicology and chemistry*, v. 11, n. 9, p. 1271-1280, 1992.

PASTOR, S. et al. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 495, n. 1, p. 147-156, 2001.

PATEL, S. et al. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 607, n. 2, p. 176-183, 2006.

PELAEZ, V.; DA SILVA, L. R.; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis*. *Science and Public Policy*, v. 40, n. 5, p. 644-656, 2013. ISSN 0302-3427.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; DA SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. *Revista de Economia*, v. 36, n. 1, 2011.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, v. 18, n. 4, p. 455-463, 2009.

PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. *Science of the total environment*, v. 386, n. 1, p. 9-20, 2007.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2003.

PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Cien Saude Colet*, v. 10, n. Supl, 2005.

PIGNATI, W. A. Saúde - doença dos trabalhadores rurais e os agrotóxicos. 2005. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto_agrotoxicos.pdf >. Acesso em: 13 fevereiro de 2018.

PIMENTEL, L. C. F. et al. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1138, 2006.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P. From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. *Ciência Rural*, v. 43, n. 10, p. 1797- 1803, 2013. ISSN 0103-8478.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. *Caderno de Saúde Pública*, v. 21, n. 3, p. 804-14, 2005.

PRÁ, T. Guecheva, S. I. R. Franke, T. Knakievicz, B. P. Erdtmann, J. A. Henriques, Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos, *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 1(2006), p. 171-175.

POMPEU, P. P.; ALVES, M. C. B.; CALLISTO, M. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas basin, Brazil. *American Fisheries Society*, 2004.

PRIMAVERA SILENCIOSA. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 5, p. 44-52, 2013. ISSN 1980-0258. Agrotóxicos: Heróis ou vilões? A face da questão que todos devem saber. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 4, p. 23-49, 2014.

RABELLO-GAY, M. Teste do micronúcleo em medula óssea. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*, Sociedade Brasileira de Genética (ed), p. 83-90, 1991.

RACHEL, C. La primavera silenciosa. Colección Drakontos Bolsillo. Editorial Crítica, Barcelona (1ª edición 1962), 2010.

RDEVELOPMENT, C. TEAM 2009: R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Internet: <http://www.R-project.org>, 2012.

REFFSTRUP, T. K.; LARSEN, J. C.; MEYER, O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, v. 56, n. 2, p. 174-192, 2010. ISSN 0273-2300.

RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. *Mutagênese Ambiental*. ULBRA, Canoas, p. 173-178, 2003.

RICHTER, E.; CHLAMTAC, N. Ames, pesticides, and cancer revisited. *International journal of occupational and environmental health*, v. 8, n. 1, p. 63-72, 2001.

RIVERO, J. et al. In vitro evaluation of oestrogenic/androgenic activity of the serum organochlorine pesticide mixtures previously described in a breast cancer case-control study. *Science of the total environment*, v. 537, p. 197-202, 2015.

ROCHA, T. A. Avaliação da citotoxicidade e ação genotóxica de extratos orgânicos e ácido úsnico de *cladonia substellata* (líquen) e derivados pirazólicos sintéticos. 104 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2015.

ROSS, G. M.; McMILLAN, T. J.; WILCOX, P.; COLLINS, A. R. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (comet assay): Technical Aspects and Applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. *Mutation Research*. 337, p. 57-60, 1995.

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

ROCHA, M. L. C. F. Indicadores ecológicos e biomarcadores de contaminação ambiental na ictiofauna da baía de Santos e do canal de Bertioga, São Paulo, Brasil. Tese (doutorado) Faculdade de Oceanografia da universidade de São Paulo. Departamento de oceanografia biológica. 2009, 225 p.

RODRIGUES, T. A. Estudo da interação biosortiva entre o corante reativo procion blue mxg e as linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650 de *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SAMUELS, S. METHOMYL (addendum). *Pesticide Residues in Food*, n. 73, p. 101, 1993.

SANTOS, F. Aplicação de pesticidas em agriculturas. 2000. Departamento de Fitotecnia e Engenharia Rural, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

SANTOS, M. D.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides—uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2008. ISSN 2179-4448.

SAÚDE, O. P.-A. D. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos: Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasília 1996.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. *Mutation Research*, v.31, p.9-15, 1975.

SPERLING, M.V. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 4 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2017.

SCURACCHIO, P.A.; FARACHE FILHO, A. Qualidade da água utilizada para consumo em escolas e creches no município de São Carlos-SP. *Alimentos e Nutrição, Araraquara*, v. 22, n. 4, p. 641-647, 2011.

SHARMA, P.; KAUR, H.; SHARMA, M.; SAHORE, V. A review on applicability of naturally available adsorbents for the removal of hazardous dyes from aqueous waste. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 183, p. 151-195, 2011.

SAFARIKOVÁ, M.; PTCÁKOVÁ, L.; KIBRIKOVÁ, I.; SAFARIKI, I. Biosorption of water-soluble dyes on magnetically modified *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *Uvarum* cells. *Chemosphere*, v. 59, p. 831–835, 2005.

SEN, S. K.; RAUT, S.; BANDYOPADHYAY, P.; RAUT, S. Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal Biology Reviews*, v. 30, p. 112-133, 2016.

SEEGER, B. et al. Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor α and β . *PloS one*, v. 11, n. 1, p. e0147490, 2016.

SEVERIN, I. et al. Genotoxic activities of the food contaminant 5- hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicology letters*, v. 192, n. 2, p. 189-194, 2010.

SILVA, H. G. A. Avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina: efeitos agudos in vivo. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2013.

SILVA, M. I. A. D. Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynosoma geoffroanus* (Schweigger, 1812)(Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo [a] pireno. 2015.

SILVA, R. H. C. Mapa agrícola brasileiro registrou alterações relevantes nos últimos 20 anos, em busca de espaço para expansão da fronteira agrícola com custos mais competitivos. Departamento de pesquisas e estudos econômicos, 2014. Disponível em:<http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/AGRO_ANALISE_25_08_14.pdf>. Acesso em: 12 de março de 2016.

SIMONIELLO, M. et al. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *Journal of Applied Toxicology*, v. 28, n. 8, p. 957-965, 2008. ISSN 1099-1263.

SCHENONE NF, Vackova L, Cirelli AF. Fish-farming water quality and environmental concerns in Argentina: a regional approach. *Aquac. Int* 2011;19:855–863.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Faixa Etária. 2012. Disponível em: <http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files/Tabela%207_2012.pdf>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2018.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*, São Miguel, 2006.

SPENCER, C. I. et al. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused

hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 298, n. 3, p. 1067-1082, 2001. ISSN 1521-0103.

TEIXEIRA, M.R. Avaliação da alcalinidade e dureza como parâmetros indicadores de qualidade da água no estuário do rio Capibaribe, Recife- PE. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas Modalidade Ambientais) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. Simpósio de Pós-Graduação em História Econômica/IV Congresso de Pós-Graduação em História Econômica/IV Encontro de Pós-Graduação em História Econômica/II Conferência Internacional de História Econômica, 2008.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.

THURMAN, E. M. et al. Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food. *Food additives and contaminants*, v. 23, n. 11, p. 1169-1178, 2006.

TIAN, Y.-T. et al. Effects of alpha-and theta-cypermethrin insecticide on transient outward potassium current in rat hippocampal CA3 neurons. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 90, n. 1, p. 1-7, 2008.

TRIPATHI, P. K.; SINGH, A. Toxic effects of cypermethrin and alphas-methrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 58, n. 2, p. 227-235, 2004.

TSAO, T. et al. Respiratory failure of acute organophosphate and carbamate poisoning. *CHEST Journal*, v. 98, n. 3, p. 631-636, 1990.

TURGUT, C. The impact of pesticides toward parrotfeather when applied at the predicted environmental concentration. *Chemosphere*, v. 66, n. 3, p. 469-473, 2007. ISSN 0045-6535.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic toxicol.* 79, p. 201-204. 2006.

UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais- Laboratório de Ecologia de Bentos.S/D. Disponível em: . Acesso em: 26 nov. 2018. Deutschmann, B.; Kolarevic, S.; Brack, W.; Kaisarevic, S.; Kostic, j. 2016. Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay B. *Science of the Total Environment*, 573: 1441–1449

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. Genotoxicidade Ambiental. in: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI. *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*, São Carlos: RiMa, cap.14, p.327-346, 2006.

US Environmental Protection Agency. (1996). Proposed guidelines for ecological risk assessment: Notice. FRL-5605-9. Federal Register, 61, 47552-47631.

VALENTINE, W. M. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 20, n. 2, p. 375-382, 1990.

VASCONCELOS, M.G. Avaliação integrada da qualidade da água do Rio Uberabinha - MG com base na caracterização química dos sedimentos e de espécimes da ictiofauna. 2012. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012. Acesso em: 15 de setembro de 2017.

VAN SCOY, A. R. et al. Environmental fate and toxicology of methomyl. In: (Ed.). *Reviews of environmental contamination and toxicology*: Springer, 2013. p.93-109. VEROCAI, G. et al. Efficacy of cypermethrin on the control of *Struthiolipeurus* spp. (Phthiraptera: Philopteridae) in ostrich. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 5, p. 1274-1276, 2008.

VIJVERBERG, H. P.; VANDEN BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical reviews in toxicology*, v. 21, n. 2, p. 105-126, 1990.

VILCHES, M. et al. Análise da genotoxicidade do Rio Cadeia (RS) utilizando ensaio cometa em peixes. 54º Congresso Brasileiro de Genética. 2008.

VALVERDE, M.; FOURTOL, T. I.; DIAZ-BARRIGA, F.; MEJÍA, J.; CASTILLO, E. R. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutation*, v. 17(1), p. 55-61, 2002.

VILLAR, S. et al. Single cell gel electrophoresis as a tool to assess genetic damage in *Heleobia cf. australis* (Mollusca: Gastropoda) as sentinel for industrial and domestic pollution in Montevideo bay (Uruguay). *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 63, n. 3, p. 347-354, 2015. ISSN 1679-8759.

VOGEL, E. *An Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology*. Block: Milieuverstorende Genotoxische Stoffen, Leiden (The Netherlands), 1989.

VON BURG, R.; LIU, D. Chromium and hexavalent chromium. *Journal Applied Toxicology*. 13, p. 225-230, 1993.

WAICHMAN, A. V.; EVE, E.; DA SILVA NINA, N. C. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, v. 26, n. 4, p. 576-583, 2007. ISSN 0261-2194.

WHITE P. A.; RASMUSSEN. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*. 410, p. 223-226. 1998.

WHITFIELD, J. Vital signs. *Nature*, v. 411, p. 989-990, 2001.

WOZNIAK, K.; JANUSZ B. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutation Research*. v.535, p.127 - 139, 2003.

ZOLLINGER, H. *Color chemistry, synthesis, properties and application of organic dyes and pigments*. Weinheim, New York, p. 367, 1987.