

Centro Universitário Feevale
Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental
Mestrado em Qualidade Ambiental

Melissa Vilches

**ANÁLISE GENOTÓXICA DO RIO CADEIA/RS
ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA E TESTE DE
MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES
UTILIZANDO PEIXES COMO BIOINDICADORES**

Novo Hamburgo, 2009

**Centro Universitário Feevale
Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental
Mestrado em Qualidade Ambiental**

Melissa Vilches

**ANÁLISE GENOTÓXICA DO RIO CADEIA/RS
ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA E TESTE DE
MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES
UTILIZANDO PEIXES COMO BIOINDICADORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental como requisito para a obtenção do título de mestre em Qualidade Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Basso da Silva

Novo Hamburgo, 2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Vilches, Melissa

Análise genotóxica do rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores / Melissa Vilches. – 2009.

54 f. : il ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

Inclui bibliografia.

“Orientador: Prof. Dr. Luciano Basso da Silva”.

1. Toxicologia genética - Rio Grande do Sul. 2. Indicadores ambientais. 3. Água - Poluição. I. Título.

CDU 628.113

Bibliotecária responsável: LÍlian Amorim Pinheiro – CRB 10/1574

Centro Universitário Feevale
Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental
Mestrado em Qualidade Ambiental

Melissa Vilches

ANÁLISE GENOTÓXICA DO RIO CADEIA/RS
ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA E TESTE DE
MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES
UTILIZANDO PEIXES COMO BIOINDICADORES

Dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora em 28 de fevereiro de 2009, conferindo ao autor o título de mestre em Qualidade Ambiental.

Componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luciano Basso da Silva (Orientador)
Centro Universitário Feevale

Profa. Dra. Patrícia Grolli Ardenghi
Centro Universitário Feevale

Prof. Dr. Victor Hugo Valiati
Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Novo Hamburgo, 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Centro Universitário Feevale por disponibilizar condições necessárias para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos, colegas de trabalho e de estudo, familiares e pessoas que de alguma forma contribuíram no passado ou no presente para que eu ingressasse e concluísse essa etapa em minha vida.

Ao meu orientador Prof.º Dr.º Luciano Basso da Silva pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho.

À Manoela Tressoldini Rodrigues pela colaboração no ensaio cometa.

À Anna Maria Siebel e Ciliana Rechenmacher pela ajuda nas saídas de campo e no ensaio cometa.

Ao “Seu Fernando”, proprietário do Balneário Amizade, o qual permitiu gentilmente a nossa entrada quando necessário.

Ao senhor Eugenio J. Hackbart que forneceu os dados meteorológicos da área de estudo.

Ao Vinícius da Silva por toda a ajuda, apoio e compreensão nesse período.

RESUMO

Os efluentes domésticos, industriais e agrícolas podem conter substâncias tóxicas, genotóxicas e mutagênicas e desencadear processos nocivos aos ambientes aquáticos. Programas de biomonitoramento com organismos bioindicadores e testes citogenéticos têm sido utilizados com o intuito de detectar corpos d'água contaminados por substâncias genotóxicas. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial genotóxico do rio Cadeia no município de Santa Maria do Herval/RS em diferentes períodos utilizando peixes como bioindicadores, concomitantemente com a análise físico-química e microbiológica da água. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa e pelos testes de micronúcleo e anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes. Foram selecionados três pontos de coleta: o ponto A situa-se na zona rural do município, o ponto B localiza-se a montante do ponto A, no início da área urbana e o ponto C localiza-se após o perímetro urbano do município. Para o ensaio cometa, as amostras de água foram coletadas nos três pontos e em três períodos distintos, levadas ao laboratório e colocadas em aquários, nos quais espécimes de *Astyanax jacuhiensis* ficaram expostos por 48 horas. No ensaio cometa foram avaliados a frequência de dano, o índice de dano e a frequência de cada uma das classes de dano. Nos testes de micronúcleo e de anormalidades nucleares foram utilizados espécimes de *Bryconamericus iheringi* coletados em quatro períodos nos pontos B e C. Para o ensaio cometa, não houve diferença significativa na frequência de células com dano entre os pontos em um mesmo período de coleta. Entretanto, verificou-se diferença significativa entre as diferentes coletas de um mesmo ponto, onde os pontos B e C apresentaram maior frequência de células com dano em fevereiro/08. As frequências de cada classe de dano entre os pontos de uma mesma coleta apresentaram diferença significativa em todas as coletas, sendo que em fevereiro/08 a classe de dano 4 foi a mais frequente nos três pontos de coleta. Quanto ao índice de dano de DNA apenas fevereiro/08 apresentou diferença significativa entre os pontos dentro de um mesmo período de coleta, onde o ponto B apresentou menor índice do que os pontos A e C. Também foram observadas diferenças significativas nos índices de dano de DNA entre as diferentes coletas de um mesmo ponto, onde fevereiro/08 apresentou maior índice nos pontos A e C. O número médio de células com MN em 2.000 células analisadas de *Bryconamericus iheringi* não apresentou diferenças significativas entre os pontos B e C nas diferentes coletas. Na comparação entre os períodos de coleta, houve diferença significativa entre as amostras do ponto B, sendo que fevereiro/08 apresentou uma frequência maior de micronúcleos do que nos outros meses. Na análise de outras anormalidades nucleares, brotos nucleares e núcleos com alteração morfológica (“blebbed”, “lobed” e “notched”) apresentaram diferenças significativas entre os pontos em uma mesma coleta e entre os diferentes períodos em um mesmo ponto. Quanto à análise físico-química e microbiológica da água foram observadas variações temporais e espaciais na qualidade da água em relação aos parâmetros DBO₅, ferro, fósforo total, alumínio e coliformes fecais. Cromo foi detectado nos pontos A, B e C apenas em fevereiro/08. Todas as amostras de água apresentaram coliformes fecais. O menor índice pluviométrico e as altas temperaturas do mês de fevereiro/08, com a conseqüente redução do nível do rio e elevação da concentração de poluentes, podem ter contribuído para a detecção de maior genotoxicidade neste período. Entretanto, não pode ser descartada também a ocorrência de variação temporal na quantidade e/ou nas fontes geradoras de compostos genotóxicos, podendo ser citado como exemplo a detecção de cromo nos três pontos de coleta somente neste período. De uma forma geral o estudo demonstrou que ocorreram variações temporais e espaciais tanto do potencial genotóxico como dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do rio analisado, podendo influenciar direta ou indiretamente a saúde humana e a qualidade de vida dos organismos expostos.

ABSTRACT

The domestic, industrial and agricultural wastewater may contain toxic, genotoxic and mutagenic and trigger processes harmful to aquatic environments. Biomonitoring programs using bioindicators and cytogenetic tests have been used in order to detect water bodies contaminated by genotoxic substances. In this context, this work had as main objective to assess the genotoxic potential of the rio Cadeia in Santa Maria of Herval / RS in different periods using fish as bioindicators, concurrently with the physical-chemical analysis and microbiological water. The genotoxicity was evaluated by comet assay and the micronucleus and nuclear abnormalities tests in erythrocytes of fish. We selected three sampling points: point A is located in rural areas of the city, point B is located upstream of point A at the beginning of the urban area and point C is located after the urban perimeter. For the comet assay, samples of water were collected in three points and three different sampling periods, brought to the laboratory and placed in aquariums, in which specimens of *Astyanax jacuhiensis* were exposed for 48 hours. Comet assay were evaluated as the frequency of damage, DNA damage index and frequency of each class of damage. In tests of micronucleus and nuclear abnormalities were used *Bryconamericus iheringi* specimens collected in four periods in B and C sampling points. For the comet assay, no significant difference in the frequency of cells with damage was observed between points in the same sampling period. However, there was significant difference between different samples from the same point where the B and C showed a higher frequency of cells with damage in the february/08 sample. Comparisons of the frequency distribution of each class of damage between the points of the same sampling period showed a significant difference in all samples, showing the class of damage 4 as the most frequent in the february/08 sample in the three sampling points. Considering the DNA damage index, only the february/08 sample showed significant difference between points within the same sampling period, where the sampling point B showed a lower index than the sampling points A and C. Significant differences also were observed in the levels of DNA damage between the different sampling periods from the same sampling point, where february/08 sample showed higher values in sampling points A and C. The average number of cells with MN in 2000 cells analyzed of *Bryconamericus iheringi* showed no significant differences between B and C sampling points in the four different sampling periods. In the comparison between the sampling periods, significant differences were observed in the B sampling point, which february/08 sample showed a higher frequency of micronuclei than in other sampling periods. In the analysis of other nuclear abnormalities, buds and nuclei with morphological changes (blebbed, lobed and notched) showed significant differences between points in the same sampling period and between different periods in the same sampling point. The physical-chemical and microbiological analysis of water showed temporal and spatial variations in water quality parameters for BOD₅, iron, total phosphorus, aluminum and fecal coliform. Chromium was detected in A, B and C only in the february/08 sample. All water samples showed fecal coliform. The lowest rainfall and high temperatures in february/08, with consequent reduction in the level of the river and increase of pollutants concentration may have contributed to detection of increased genotoxicity in this period. However, it can not be ruled out the occurrence of temporal variation in the quantity and/or in the generating sources of genotoxic compounds and may be cited as example the detection of chromium in the three sampling points only in that sampling period. In general the study showed that there were both temporal and spatial variations of the genotoxic potential and in the physico-chemical and microbiological analysis of the river, which directly or indirectly can influence human health and quality of life of the exposed organisms.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa da Bacia Hidrográfica do rio Caí.....21
- Figura 2 - Mapa da sub-bacia do rio Cadeia com a área urbana de Santa Maria do Herval em destaque. Adaptado de RODRIGUES e FORMOSO (2005).....24
- Figura 3 - Mapa da localização do município de Santa Maria do Herval no estado do Rio Grande do Sul.....25
- Figura 4 - Esquema dos pontos de coleta (A, B, C) no rio Cadeia em Santa Maria do Herval. O ponto A localiza-se antes do centro urbano e na área rural do município; o ponto B localiza-se no centro do município no Balneário Amizade; o ponto C localiza-se após todo o perímetro urbanizado do município, na Usina Hidrelétrica Herval.27
- Figura 5 - Classes de danos de DNA utilizadas no ensaio cometa. A - Classe 0 ; B - Classe 1; C- Classe 2; D - Classe 3; E - Classe 4.....30
- Figura 6 – A: MN: Micronúcleo; BN: Eritrócito binucleado; BRN: Broto nuclear; BL: Núcleo “blebbed”; LB: Núcleo “lobed”; NT: Núcleo “notched”. (BN, BL, LB, NT imagens de JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2008)32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classes de água doce e seus usos de acordo com a resolução CONAMA 357/2005.....	19
Tabela 2 - Dados climatológicos da região de estudo nos meses de coleta obtidos juntos a METSUL Meteorologia.....	28
Tabela 3 - Metodologia e procedimentos utilizados nos ensaios laboratoriais para cada parâmetro segundo FEPAM.....	34
Tabela 4 - Valores de referência para a classificação das amostras de água analisadas (segundo Resolução 357/2005 do CONAMA).....	35
Tabela 5 – Média \pm desvio padrão da frequência de células com dano de DNA no ensaio cometa em <i>Astyanax jacuhiensis</i> e número de indivíduos analisados (entre parênteses) nos pontos A, B e C nas três coletas do rio Cadeia. Valores de p para as comparações entre as coletas em um mesmo ponto são apresentados na última coluna e na última linha para as comparações entre os pontos em uma mesma coleta.....	38
Tabela 6 - Frequência das classes de dano do ensaio cometa em <i>Astyanax jacuhiensis</i> nos pontos A, B e C do rio Cadeia em cada período de amostragem.....	39
Tabela 7 – Média e desvio padrão do índice de danos de DNA em <i>Astyanax jacuhiensis</i> e número de indivíduos analisados (<i>N</i>) nos pontos A, B e C do rio Cadeia, nos períodos de coleta novembro/2007, fevereiro/2008 e outubro/2008. Valores de p para as comparações entre as coletas em um mesmo ponto são apresentados na última coluna e na última linha para as comparações entre os pontos em uma mesma coleta.....	40
Tabela 8 – Média e desvio padrão do número de micronúcleos em 2.000 células de <i>Bryconamericus iheringi</i> e número de indivíduos analisados (<i>N</i>) nos pontos B e C do rio Cadeia em cada período de coleta. Valores de p para as comparações entre as coletas em um mesmo ponto são apresentados na última coluna e na última linha para as comparações entre os pontos em uma mesma coleta.....	41
Tabela 9 - Média e desvio padrão das alterações nucleares nos eritrócitos de <i>Bryconamericus iheringi</i> coletados nos pontos B e C do rio Cadeia em quatro períodos de coletas.....	42

Tabela 10 - Valores dos parâmetros analisados nas amostras de água coletadas nos três pontos de amostragem do rio Cadeia nos quatro períodos de coleta. PA = Ponto A; PB = Ponto B; PC = Ponto C.....43

Tabela 11 - Enquadramento das águas dos pontos analisados do rio Cadeia durante o período monitorado. PA = Ponto A; PB = Ponto B; PC = Ponto C. Classe 1: ■; Classe 2: ■; Classe 3: ■; Classe 4: ■.....44

SUMÁRIO

Resumo.....	V
<i>Abstract</i>	VI
Lista de figuras.....	VII
Lista de tabelas.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 Genética toxicológica e biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.....	4
3.1.1 Ensaio cometa.....	6
3.1.2 Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	8
3.1.3 Estudos de genotoxicidade em rios utilizando ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em peixes.....	9
3.2 Análise físico-química e microbiológica e classificação das águas superficiais.....	11
3.2.1 DBO ₅ (Demanda bioquímica de oxigênio).....	12
3.2.2 Nitrogênio (nitrogênio amoniacal, nitratos e nitritos).....	12
3.2.3 Fósforo total.....	13
3.2.4 Alumínio.....	13
3.2.5 Chumbo.....	14
3.2.6 Cromo.....	14
3.2.7 Cobre.....	14
3.2.8 Níquel.....	15
3.2.9 Ferro.....	15
3.2.10 Zinco.....	15
3.2.11 pH.....	16
3.2.12 Turbidez.....	16
3.2.13 Oxigênio dissolvido.....	17
3.2.14 Coliformes fecais (<i>Escherichia coli</i>).....	18
3.3 Características da área de estudo.....	20
3.3.1 Bacia Hidrográfica do rio Caí.....	20
3.3.2 Sub-bacia do rio Cadeia.....	23
3.3.3 Município de Santa Maria do Herval.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Área de estudo, locais e períodos de coleta.....	26
4.2 Metodologia.....	28
4.2.1 Ensaio cometa.....	28
4.2.1.1 Bioensaios.....	28

4.2.1.2	Preparação das lâminas e análise microscópica.....	29
4.2.2	Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	31
4.2.2.1	Coleta dos peixes.....	31
4.2.2.2	Preparação das lâminas e análise microscópica.....	31
4.2.3	Análise físico-química e microbiológica da água.....	32
4.2.3.1	Coleta da água.....	32
4.2.3.2	Análise laboratorial.....	33
4.2.4	Análise estatística.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Ensaio cometa.....	37
5.2	Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	40
5.3	Análise físico-química e microbiológica da água.....	42
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1.INTRODUÇÃO

A água utilizada para sanar as necessidades humanas em seus mais variados aspectos é em sua maior parte proveniente de corpos hídricos superficiais. Entre as utilizações dos corpos hídricos superficiais, destaca-se o seu uso no abastecimento das populações humanas, geração de energia, irrigação, navegação, aqüicultura, além de importância paisagística (SPERLING, 1993). No entanto, o crescimento populacional desordenado juntamente com o desenvolvimento tecnológico tem gerado impactos graves a estes corpos hídricos principalmente no que diz respeito à destinação de efluentes industriais e domésticos (VAN DER WERF, 1996; MORAES, 2000). Em função de a água ser um solvente universal e ter a capacidade de dissolver diversas substâncias, os ambientes aquáticos têm sido utilizados como meio de descarte de diferentes produtos (WHITE e RASMUSSEN, 1998).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (*U.S. Environmental Protection Agency* - EPA) o termo poluição significa presença de uma substância no ambiente que, devido à sua composição química ou quantidade, prejudica o funcionamento dos processos naturais, produzindo efeitos indesejáveis sobre a saúde e ambientes, sendo considerado como poluente qualquer material que cause poluição. De maneira geral é o resultado do grande descaso do homem com o meio ambiente, onde o aumento da população, a expansão do consumo e a descarga de produtos no meio ambiente são suas principais causas (WRIGHT e NOBEL, 2000).

Existem centenas, talvez milhares de poluentes que afetam o meio ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Os poluentes aquáticos mais freqüentes são os patógenos, os resíduos orgânicos, os sedimentos, nutrientes e os poluentes químicos. Tais poluentes podem se espalhar pela superfície e/ou pela coluna d'água formando "soluções", que podem resultar em efeitos indesejáveis ao ecossistema. Poluentes orgânicos como os pesticidas, compostos químicos industriais (como é o caso das bifenilas policloradas - BPCs), solventes, detergentes e os derivados de petróleo são prejudiciais para o ecossistema aquático (WRIGHT e NOBEL, 2000).

Estudos relatam que diversos rios estão contaminados por substâncias tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas decorrentes do descarte de efluentes domésticos e industriais (CLAXTON *et al.*, 1998; WHITE e RASMUSSEN, 1998) além de agrotóxicos utilizados em áreas adjacentes aos corpos d'água (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

São considerados agentes genotóxicos aqueles que interagem com o DNA e ou com seus componentes celulares (fibras do fuso) e enzimas (topoisomerases). O termo

genotoxicidade inclui formação de adutos no DNA, lesões na fita do DNA, síntese de DNA não programada, trocas entre cromátides-irmãs, enquanto que mutagenicidade é especificamente a indução de mutação ao nível gênico ou cromossômico. Enquanto os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, os efeitos mutagênicos são persistentes. Portanto, mutagenicidade é uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD *et al.*, 2002).

Com o intuito de minimizar as conseqüências da poluição nos ecossistemas aquáticos os programas de monitoramento ambiental têm sido aplicados em todo o mundo (CAPELA, 2001).

A utilização de bioindicadores e testes citogenéticos ajudam a avaliar o dano causado não apenas à integridade físico-química do ambiente, mas sim a resposta dos organismos a mudanças ambientais decorrentes da poluição ambiental (MORAES, 2000). Em ecossistemas aquáticos os testes mais utilizados são os testes de micronúcleo e de anormalidades nucleares e o ensaio cometa utilizando peixes como organismos bioindicadores. Muitos estudos já avaliaram a genotoxicidade de efluentes industriais, enquanto que ainda são raros os que avaliam a ação dos poluentes provenientes de descartes da agricultura (JHA *et al.*, 1997).

Juntamente com análises genotóxicas, muitos trabalhos tem utilizado parâmetros físico-químicos e microbiológicos como importante ferramenta nos monitoramentos de ecossistemas aquáticos. Tais parâmetros possibilitam o enquadramento da água em classes conforme suas condições de uso segundo a resolução nº 357 de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA).

Neste contexto, o presente trabalho visou realizar uma análise integrada da ação genotóxica em peixes das águas do rio Cadeia, utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleo, com os parâmetros físico-químicos utilizados no enquadramento de classe de água doce superficial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Monitorar o potencial genotóxico, através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em peixes, e as características físico-químicas e microbiológicas das águas do rio Cadeia no município de Santa Maria do Herval/RS.

2.2 Objetivos Específicos:

- Comparar as taxas de danos de DNA dos peixes em diferentes pontos de coleta;
- Avaliar as taxas de danos de DNA dos peixes periodicamente;
- Comparar o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares e o ensaio de cometa quanto à sensibilidade aos danos de DNA;
- Analisar periodicamente as características físico-químicas e microbiológicas da água;
- Verificar a associação entre as taxas de danos de DNA nos peixes e as características físico-químicas e microbiológicas da água;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Genética toxicológica e biomonitoramento de ecossistemas aquáticos

Em decorrência da grande urbanização e crescimento tecnológico aumentou consideravelmente o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em monitorar as conseqüências dos impactos decorrentes da ação antrópica sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (BICKHAM *et al.*, 2000).

A presença de substâncias tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas tem sido relatada em diversos estudos de rios que sofrem influência do descarte de efluentes domésticos e industriais. O descarte de tais substâncias se caracteriza em um sério e grave problema que apesar da legislação vigente continua ocorrendo irresponsavelmente (CLAXTON *et al.*, 1998; WHITE e RASMUSSEN, 1998). A situação é agravada pelos diversos tipos de agrotóxicos utilizados na agricultura, os quais podem alcançar os corpos de água através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Substâncias genotóxicas podem não contaminar apenas os organismos aquáticos por si só, mas sim o ecossistema inteiro podendo afetar os humanos através da ingestão desses organismos na alimentação (VON BURG e LIU, 1993), como é o caso dos metais pesados que apresentam ação genotóxica, mutagênica e carcinogênica (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo quebras da molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio sistema de reparo da célula ou a mesma é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provocando mutações, que podem perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é considerado mutagênico (MÍDIO e MARTINS, 2000). Embora as mutações possam surgir espontaneamente, a maioria delas é provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004).

Alguns trabalhos relatam que os danos no DNA geram instabilidade genética, o que pode representar os passos iniciais para o processo carcinogênico além da redução da viabilidade e fertilidade de gametas (MÍDIO e MARTINS, 2000; RIBEIRO, 2003).

Segundo LEE e STEINERT (2003), compostos químicos que causam danos no DNA podem ser agrupados em quatro grupos: (1) aqueles que agem diretamente sobre a molécula; (2) os que precisam ser metabolizados para causarem danos; (3) os que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio e (4) aqueles que causam inibição no reparo e na síntese do DNA.

A genética toxicológica aquática tem a intenção de determinar o efeito de xenobióticos, isto é, de substâncias de estrutura e origem estranhas encontradas em um organismo, sobre a função e a estrutura de ecossistemas aquáticos, e um de seus objetivos principais é o desenvolvimento de técnicas capazes de medir a contaminação ambiental (BICKHAM *et al.*, 2000; MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Muitos trabalhos foram desenvolvidos buscando a detecção de agentes genotóxicos e o entendimento das propriedades desses agentes permite avaliar os efeitos hereditários, ou mesmo letais, para os organismos (ARNAIZ, 1995). Segundo CAIRNS *et al.* (1993), é preciso buscar uma categorização da influência humana sobre os ambientes bem como distinguir os efeitos dessas ações das naturais.

Neste contexto, biomonitoramento é o uso sistemático das respostas de organismos vivos, seja ele como um todo ou, através de determinado tecido, para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por atividades antrópicas (SILVA *et al.*, 2003).

Desta forma, diversos testes de curta duração têm sido desenvolvidos nas últimas décadas utilizando microrganismos, insetos, plantas e animais para identificar agentes que promovem dano genético (HOUK, 1992). Segundo CAPELA (2001), 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.

A seleção do ensaio apropriado para um determinado estudo depende das características da amostra a ser testada, da validade do sistema-teste e de sua base de dados acumulados, da utilidade do ensaio para amostras ambientais complexas, de seu custo relativo e de sua simplicidade. Bioensaios em procariotos detectam agentes que induzem mutações gênicas e danos primários no DNA que é o caso da análise de mutagenicidade em *Salmonella*, ou teste de Ames. Porém, análises em eucariotos permitem detectar uma amplitude maior de danos, incluindo mutações gênicas, danos e reparo do DNA, danos cromossômicos e aneuploidias (HOUK, 1992).

Os peixes são considerados importantes bioindicadores de água poluída (HOFFMAN e RAAT, 1982), pois como vertebrados aquáticos, metabolizam poluentes diretamente através da água contaminada ou indiretamente pela ingestão de outros organismos aquáticos contaminados (MATSUMOTO *et al.*, 2006) respondendo de forma similar aos vertebrados superiores quando expostos as substâncias tóxicas (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

Com o objetivo de avaliar os riscos à saúde de vertebrados superiores, diversos ensaios de genotoxicidade *in vivo* têm empregado, com frequência, diferentes espécies de peixes

como bioindicadores (POWERS, 1989). Esses animais podem facilmente ser mantidos em laboratório e expostos a compostos químicos. O uso de peixes como bioindicadores de índices de efeitos de poluição é de extrema importância, pois eles podem permitir uma detecção precoce de problemas ambientais aquáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; FRENZILLI *et al.*, 2004).

O uso de exemplares de espécies nativas de peixes para a avaliação da mutagenicidade de xenobióticos é relevante, visto que há a necessidade de preservar tais espécies, além do que, através da alimentação, muitos deles são agentes de transferência de contaminantes ao homem (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O método de análise da ação de compostos mutagênicos e de contaminantes químicos mais utilizado em peixes é o teste de micronúcleo (MN) (AL-SABTI, 1986; METCALF, 1988) embora o ensaio cometa seja mais sensível para detectar diferentes danos de DNA (BUCKER *et al.*, 2006).

3.1.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa tem sido proposto para estudos de toxicologia genética devido às suas vantagens e peculiaridades quando comparado a outros testes que detectam substâncias genotóxicas, sendo uma ferramenta fundamental de investigação em estudos de reparo de DNA, biomonitoramento ambiental e teste de genotoxicidade (ROSS *et al.*, 1995).

O ensaio cometa (SCGE, Single-Cell Gel Electrophoresis, eletroforese em gel de células individuais) não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem ser processadas levando às mutações (GONTIJO e TICE, 2003) o que caracteriza em lesões pré-mutagênicas (KAMMANN *et al.*, 2001). O ensaio cometa possui uma ampla utilização para avaliar agentes genotóxicos de efluentes industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparo no DNA e biomonitoramento de populações (WHITE e RASMUSSEN, 1998). A principal vantagem do ensaio de cometa é sua alta sensibilidade a vários tipos de danos de DNA (BUCKER *et al.*, 2006), sendo considerado em alguns casos mais sensível à ação de agentes genotóxicos do que o teste de micronúcleo (MATSUMOTO *et al.*, 2006; BUCKER *et al.*, 2006). Além de outras vantagens como: (1) mensuração de danos em células individuais; (2) o baixo número de células necessário para a realização do teste; (3) pode ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (LEE e STEINERT, 2003).

Os pioneiros a desenvolverem a técnica de eletroforese em gel para detectar danos de DNA em células individuais foram ÖSTLING e JOHANSON (1984). Essa técnica considerou

o comportamento e organização do DNA dentro do núcleo. Ao ser compactado, o DNA é enovelado com proteínas histonas, formando alças, as quais são aderidas a uma rede protéica chamada de matriz nuclear. No ensaio, as células foram embebidas em agarose, colocadas em uma lâmina de microscopia e levadas a uma solução detergente que lisa suas membranas e proteínas nucleares. O DNA, que é maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupa o espaço do gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, denominada nucleóide. Caso existam quebras na molécula de DNA a estrutura do nucleóide sofre mudanças (COOK e BRAZEL, 1976). As lâminas que possuíam células com alta quebra de DNA mostram, após eletroforese sob condições neutras, uma migração crescente de DNA em direção ao ânodo, dando uma aparência ao DNA semelhante à cauda de um cometa. As células cujo dano de DNA é pouco ou inexistente não apresentam cauda. Foi utilizada coloração fluorescente específico para DNA.

Em 1988, SINGH *et al.* desenvolveram o ensaio cometa sob condições alcalinas (pH>13), o que intensificou a eficiência da técnica. Essa alteração possibilitou a detecção de quebras de fita simples, quebras de fita dupla, sítio álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (TICE *et al.*, 2000). A técnica também sofreu outra adaptação quando MCNAMEE *et al.* (2000) propuseram que várias células fossem processadas de uma só vez, aumentando ainda mais a eficiência sem comprometer a sua confiabilidade.

O grau de dano no DNA que o teste considera pode ser descrito de várias maneiras, como a quantidade de DNA na cauda, o comprimento da cauda e a porcentagem de células com diferentes classes de danos (TICE, 1995).

Trabalhos relatam com sucesso a aplicação do ensaio cometa em eritrócitos de peixes destacando a sensibilidade das células sangüíneas desses animais aos efeitos genotóxicos (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998). Dados de estudos usando o ensaio cometa em peixes vêm se acumulando nos últimos anos, tanto no campo (DE FLORA *et al.*, 1993; MINISSI *et al.*, 1996; BELPAEME *et al.*, 1998; HAYASHI *et al.*, 1998; RUSSO *et al.*, 2004) como em laboratório (PANDRANGI *et al.*, 1995 e BELPAEME *et al.*, 1998).

3.1.2 Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares

O teste de micronúcleo que foi inicialmente desenvolvido por SCHIMID (1975), é recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar tanto agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), como aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003) e também por se tratar de um método simples, confiável, sensível e de baixo custo para analisar impacto biológico de ambientes aquáticos poluídos (RUSSO *et al.*, 2004). O micronúcleo (MN) é uma pequena massa nuclear delimitada por uma membrana independente do núcleo principal que aparece nas células filhas como consequência de danos, não reparados, ocorridos nas células mães (WALKER *et al.*, 1996). Os MNs são formados durante a divisão celular quando a membrana nuclear está sendo reconstituída ao redor dos cromossomos das células-filhas. São decorrentes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Como se trata de material genético que foi separado do núcleo principal, o MN representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou numérico (cromossomo inteiro) ou ainda dano no aparelho mitótico. A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células. Os MNs formados por agentes genotóxicos só apareceram após um ciclo de divisão celular (SALVADORI *et al.*, 2003). Danos cromossômicos estruturais estão relacionados à exposição direta do agente mutagênico com o DNA ou com defeitos intracelulares na replicação do DNA, recombinação ou mecanismo de reparo (FENECH, 2000).

HOOFMAN E RAAT (1982) adaptaram o teste de micronúcleo para aplicação em peixes. Por apresentarem cromossomos pequenos, em grande quantidade, e com baixo índice mitótico, a aplicação do teste de micronúcleo na maioria das espécies de peixes tornou-se extremamente vantajoso quando comparado a outros testes mutagênicos (KLIGERMAN, 1982). AL-SABTI e METCALFE (1995) descrevem o quanto apropriado são os eritrócitos de peixes para a aplicação deste teste por formarem micronúcleos de fácil contagem e pelo fato do sangue periférico ser de fácil obtenção. UDROIU (2006) em uma revisão sobre a aplicabilidade do teste de micronúcleo em espécies de peixes conclui que este teste é aplicado com sucesso em diversos trabalhos que visam estabelecer relações entre danos de DNA com possíveis substâncias genotóxicas. Mostra ainda que o teste de micronúcleo quando realizado com sangue periférico é particularmente indicado para avaliar casos de exposição crônica do organismo ao meio contaminado. Alguns estudos demonstraram que, para algumas substâncias, a indução de micronúcleo em eritrócitos de peixes depende da dose (MANNA *et*

al., 1985; BÜCKER *et al.*, 2006) e do tempo de exposição dos mesmos às substâncias testadas (DAS e NANDA, 1986).

A grande limitação do uso de micronúcleos para a identificação de danos citogenéticos é que agentes ou substâncias que não quebram cromossomos ou não causam a perda destes na anáfase, não serão detectados, como por exemplo, as aberrações que envolvem rearranjo cromossômico sem ocorrência de fragmento acêntrico (HEDDLE *et al.*, 1983).

Durante as análises de micronúcleos, alguns pesquisadores observaram a existência de outras anormalidades nucleares, sugerindo que estas devam ser reportadas em seus resultados (FENECH *et al.*, 1999). Segundo FENECH (2000) essas anormalidades relacionam-se aos erros que ocorrem durante a mitose ou meiose, com os processos de morte celular (necrose e apoptose) além da própria genotoxicidade e mutagenicidade. Entre as anormalidades o autor recomenda que sejam analisadas as células com brotos nucleares. Os brotos nucleares, assim como os “broken-eggs”, seriam o resultado do procedimento de expulsão do micronúcleo do núcleo principal da célula (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002). Outra análise reportada por CARRASCO *et al.* (1990) considera alterações da morfologia do núcleo, chamadas de “blebbed”, “lobed” e “notched”, tendo como possível causa a ação mutagênica, embora o mecanismo de formação ainda não tenha sido esclarecido. Núcleos “blebbed” apresentam uma pequena invaginação da membrana e da cromatina, enquanto que os “lobed” apresentam uma invaginação maior da membrana e da cromatina, formando lobos e o núcleo “notched” apresenta profundas invaginações ou ainda lacunas que não contém cromatina.

3.1.3 Estudos de genotoxicidade em rios utilizando ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em peixes

AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000) analisaram a frequência de micronúcleos e de alterações nucleares em *Poecilia latipinna* e *Phoxinus phoxinus* submetidas a tratamentos com substâncias cuja ação genotóxica já é conhecida. Os peixes tratados com colchicina e mitomicina C apresentaram aumento da frequência de micronúcleo e de outras anormalidades nucleares em relação ao controle, enquanto que os peixes tratados com ciclofosfamida apresentaram apenas aumento da frequência de anormalidades nucleares em relação ao controle. Neste mesmo trabalho a ação genotóxica do cádmio e do mercúrio também foi testada. Os peixes tratados com diferentes dosagens de cádmio apresentaram aumento da frequência de anormalidades nucleares e não da frequência de micronúcleo em relação ao controle, enquanto que no tratamento com mercúrio, apenas uma das espécies apresentou aumento da frequência de anormalidades nucleares em relação ao controle.

Em um outro estudo, três espécies de peixes (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*) foram analisadas em um lago em Brasília sob influência do descarte de adubos de plantações adjacentes. Os resultados indicaram que os peixes coletados no ponto de descarte e no ponto abaixo do descarte apresentaram maior frequência de micronúcleos do que os peixes coletados acima destes pontos. As análises físico-químicas da água mostraram que os dois pontos com influência do descarte de adubo apresentaram maior concentração de fósforo. Isto indica que existe uma relação entre a eutrofização das águas e o aumento da frequência de micronúcleos dos peixes (GRISOLIA e STARLING, 2001).

ANDRADE *et al.* (2004) avaliaram a ação genotóxica dos rios Tramandaí e Mampituba, na zona estuarina do Rio Grande do Sul, em duas espécies de peixes (*Mugil sp.* e *Netuma sp.*) a partir do teste de micronúcleo e do ensaio cometa. Verificaram que no verão, estação que apresenta maior número de habitantes no local estudado, aumenta significativamente as taxas de danos de DNA de ambas as espécies, nos dois locais de estudo, mostrando a forte associação entre a quantidade de efluentes domésticos descartados nos rios e o aumento das taxas de danos de DNA dos peixes.

Ao analisarem a relação entre a concentração de mercúrio e o aumento da frequência de micronúcleos em três espécies de peixes (*Prochilodus nigricans*, *Mylossoma duriventris* e *Hoplias malabaricus*) de um rio da Bacia Amazônica PORTO *et al.* (2005) verificaram que as frequências de micronúcleo aumentam conforme o aumento da concentração do mercúrio nas três espécies analisadas destacando-se que a espécie de hábito alimentar piscívora apresentou maior taxa de dano de DNA do que as outras espécies, o que demonstra a biomagnificação do mercúrio na rede trófica.

As águas de um rio em São Paulo, apresentaram aumento de danos de DNA em *Oreochromis niloticus* tanto no teste de micronúcleo como no ensaio cometa conforme aumentava a concentração de metais pesados derivados de resíduos de curtume descartados no rio (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

GUILHERME *et al.* (2008) avaliaram a ação genotóxica de uma área contaminada por mercúrio, Laranjo (Aveiro/Portugal), através do teste de anormalidades nucleares em *Liza aurata*. Neste estudo verificaram um aumento de anormalidades nucleares no local contaminado por mercúrio tanto no verão como no outono em relação ao controle.

A ação do ácido domóico, uma toxina sintetizada por algumas espécies de algas marinhas, foi testada em diferentes concentrações e tempos de exposição em *Oreochromis niloticus* através do teste de micronúcleo e anormalidades nucleares e do ensaio cometa. Neste estudo verificaram que em tempos e concentrações maiores de exposição ocorreu um aumento

da freqüência de micronúcleo e anormalidades nucleares assim como altas concentrações de ácido domóico induziu um aumento no índice de dano avaliado no ensaio cometa (ÇAVAS e KÖNEN, 2008).

3.2 Análise físico-química e microbiológica e classificação das águas doces superficiais

Com o intuito de complementar a análise genotóxica de ecossistemas aquáticos, alguns trabalhos tem utilizado a análise das características físico-químicas e microbiológicas da água. ANDRADE *et al.* (2004), analisaram a associação das taxas de dano de DNA em *Mugil sp.* e *Netuma sp.*, de dois rios no sul do Brasil. Verificaram haver correlações positivas entre a taxa de dano de DNA, pH e a temperatura da água. O pH diminui em estações mais quentes o que propicia um aumento na dissolução dos íons de metais e, portanto na sua concentração, aumentando a taxa de dano de DNA dos organismos expostos. A concentração de metais encontrada durante as estações reforça essa associação, pois estas foram mais altas no verão e na primavera do que no outono e inverno. Em outro estudo, MATSUMOTO *et al.* (2006) verificaram uma associação entre o aumento das concentrações de cromo e o aumento das freqüências de anormalidades nucleares entre outros marcadores moleculares em *Oreochromis niloticus*.

O conhecimento das características físico-químicas e microbiológicas só é possível de acordo com um monitoramento seqüencial, planejado e sistêmico, sendo esta ferramenta essencial para a tomada de decisões que possam amenizar impactos ambientais causados pela ocupação do solo e industrialização (NAIME e FAGUNDES, 2005).

Os critérios de qualidade da água tornam específicos as concentrações e limites de determinados parâmetros que interferem na vida aquática e na proteção da saúde do homem. Os padrões de qualidade dos corpos receptores de efluentes estão inter-relacionados com os padrões de lançamento de efluentes, sendo o objetivo de ambos os padrões a preservação da qualidade das águas dos corpos hídricos (VON SPERLING, 1998).

A análise físico-química da água possibilita o enquadramento das águas em classes conforme suas condições de uso segundo resolução 357 de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Os principais parâmetros físico-químicos e microbiológicos utilizados na determinação da qualidade da água são (CETESB, 2006):

3.2.1 DBO₅ (Demanda bioquímica de oxigênio)

A DBO₅ de uma água é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana aeróbia para uma forma inorgânica estável. A DBO₅ é normalmente considerada como a quantidade de oxigênio consumido durante um determinado período de tempo, numa temperatura de incubação específica. Os maiores aumentos em termos de DBO₅, num corpo d'água, são provocados por despejos de origem predominantemente orgânica. A presença de um alto teor de matéria orgânica pode induzir à completa extinção do oxigênio na água, provocando o desaparecimento de peixes e outras formas de vida aquática.

3.2.2 Nitrogênio (nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato)

São diversas as fontes de nitrogênio nas águas naturais. Os esgotos sanitários constituem em geral a principal fonte, lançando nas águas nitrogênio orgânico devido à presença de proteínas e nitrogênio amoniacal, devido à hidrólise sofrida pela uréia na água. Alguns efluentes industriais também concorrem para as descargas de nitrogênio orgânico e amoniacal nas águas, como algumas indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, de conservas alimentícias, matadouros, frigoríficos e curtumes. Nas áreas agrícolas, o escoamento das águas pluviais pelos solos fertilizados também contribui para a presença de diversas formas de nitrogênio. Também nas áreas urbanas, as drenagens de águas pluviais associadas às deficiências do sistema de limpeza pública, constituem fonte difusa de difícil caracterização. O nitrogênio pode ser encontrado nas águas nas formas de nitrogênio orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato. As duas primeiras chamam-se formas reduzidas e as duas últimas, formas oxidadas. Quando descarregado nas águas naturais conjuntamente com o fósforo e outros nutrientes presentes nos despejos, provocam o enriquecimento do meio tornando-o mais fértil e possibilitam o crescimento em maior extensão dos seres vivos que os utilizam, especialmente as algas, o que é chamado de eutrofização e que pode trazer prejuízos aos usos que se possam fazer dessas águas, prejudicando seriamente o abastecimento público ou causando poluição por morte e decomposição. A amônia é um tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, sendo que muitas espécies não suportam concentrações acima de 5 mg/L. Além disso, a amônia provoca consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente, a chamada DBO de segundo estágio. Por estes motivos, a concentração de nitrogênio amoniacal é importante parâmetro de classificação das águas naturais e normalmente utilizado na constituição de índices de qualidade das águas. Os

nitratos são tóxicos, causando uma doença chamada metahemoglobinemia infantil que é letal para crianças (o nitrato se reduz a nitrito na corrente sanguínea, competindo com o oxigênio livre, tornando o sangue azul).

3.2.3 Fósforo total

O fósforo aparece em águas naturais devido principalmente às descargas de esgotos sanitários. Nestes, os detergentes superfosfatados empregados em larga escala domesticamente constituem a principal fonte, além da própria matéria fecal, que é rica em proteínas. Alguns efluentes industriais, como os de indústrias de fertilizantes, pesticidas, químicas em geral, conservas alimentícias, abatedouros, frigoríficos e laticínios, apresentam fósforo em quantidades excessivas. As águas drenadas em áreas agrícolas e urbanas também podem provocar a presença excessiva de fósforo em águas naturais. Assim como o nitrogênio, o fósforo constitui-se em um dos principais nutrientes para os processos biológicos, ou seja, é um dos chamados macro-nutrientes, por ser exigido também em grandes quantidades pelas células. Por ser nutriente em processos biológicos, o excesso de fósforo em esgotos sanitários e efluentes industriais, conduz a processos de eutrofização das águas naturais.

3.2.4 Alumínio

O alumínio é produzido e consumido em grandes quantidades em muitas nações, sendo o Brasil um dos maiores produtores. É o principal constituinte de um grande número de componentes atmosféricos, particularmente de poeira derivada de solos e partículas originadas da combustão de carvão. Em áreas urbanas, a concentração de alumínio na poeira das ruas varia de 3,7 a 11,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No ar, a concentração varia de 0,5 ng/m^3 sobre a Antártica a mais de 1000 ng/m^3 em áreas industrializadas. Na água, o alumínio é complexado e influenciado pelo pH, temperatura e a presença de fluoretos, sulfatos, matéria orgânica e outros ligantes. A solubilidade é baixa em pH entre 5,5 e 6,0. O alumínio deve apresentar maiores concentrações em profundidade, onde o pH é menor e pode ocorrer anaerobiose. Se a estratificação, e conseqüente anaerobiose, não for muito forte, o teor de alumínio diminui no corpo de água como um todo. Há considerável evidência que o alumínio é neurotóxico. Em experimentos com animais, porém há uma grande variação desse efeito, dependendo da espécie analisada. Não há indicação de carcinogenicidade para o alumínio.

3.2.5 Chumbo

O chumbo está presente na água devido às descargas de efluentes industriais como, por exemplo, os efluentes das indústrias de acumuladores (baterias), bem como devido ao uso indevido de tintas e tubulações e acessórios a base de chumbo (materiais de construção). O chumbo e seus compostos também são utilizados em eletrodeposição e metalurgia. Constitui veneno cumulativo, provocando um envenenamento crônico denominado saturnismo, que consiste em efeito sobre o sistema nervoso central com conseqüências bastante sérias. Aos peixes, as doses fatais variam de 0,1 a 0,4 mg/L, embora, em condições experimentais, alguns resistam até 10 mg/L. Outros organismos (moluscos, crustáceos, mosquitos quironomídeos e simulídeos, vermes oligoquetos, sanguessugas e insetos tricópteros), desaparecem após a morte dos peixes, em concentrações superiores a 0,3 mg/L.

3.2.6 Cromo

As concentrações de cromo em água doce são muito baixas, normalmente inferiores a 1 µg/L. É comumente utilizado em aplicações industriais e domésticas, como na produção de alumínio anodizado, aço inoxidável, tintas, pigmentos, explosivos, papel, fotografia. O cromo é amplamente utilizado em indústrias de curtume. Na forma trivalente o cromo é essencial ao metabolismo humano e, sua carência, causa doenças. Na forma hexavalente é tóxico e cancerígeno. Os limites máximos são estabelecidos basicamente em função do cromo hexavalente. O cromo exerce efeito prejudicial sobre processos biológicos, atuando sobre enzimas catalisadoras da síntese de proteínas. Microrganismos podem suportar concentrações de apenas miligramas por litro (NAIME E FAGUNDES, 2005). Alguns estudos têm verificado a associação de aumento das taxas de dano de DNA em organismos bioindicadores e altas concentrações de cromo (TAGLIARI *et al.*, 2006; BIANCHI *et al.*, 1983).

3.2.7 Cobre

O cobre ocorre geralmente nas águas, naturalmente, em concentrações inferiores a 20 µg/L. Para os peixes, muito mais que para o homem, as doses elevadas de cobre são extremamente nocivas. Assim, trutas, carpas, bagres, peixes vermelhos de aquários ornamentais e outros, morrem em dosagens de 0,5 mg/L. Os peixes morrem pela coagulação do muco das brânquias e conseqüente asfixia (ação oligodinâmica). Os microrganismos perecem em concentrações superiores a 1,0 mg/L. As fontes de cobre para o meio ambiente

incluem corrosão de tubulações de latão por águas ácidas, efluentes de estações de tratamento de esgotos, uso de compostos de cobre como algicidas aquáticos, escoamento superficial e contaminação da água subterrânea a partir de usos agrícolas do cobre como fungicida e pesticida no tratamento de solos e efluentes, e precipitação atmosférica de fontes industriais. As principais fontes industriais incluem indústrias de mineração, fundição e refinação.

3.2.8 Níquel

O níquel é também utilizado em galvanoplastias. Estudos recentes demonstram que é carcinogênico. Não existem muitas referências bibliográficas quanto à toxicidade do níquel; todavia, assim como para outros íons metálicos, é possível mencionar que, em soluções diluídas, estes elementos podem precipitar a secreção da mucosa produzida pelas brânquias dos peixes. Assim, o espaço inter-lamelar é obstruído e o movimento normal dos filamentos branquiais é bloqueado. O peixe, impedido de realizar as trocas gasosas entre a água e os tecidos branquiais, morre por asfixia. Por outro lado, o níquel complexado (níquelcianeto) é tóxico quando em baixos valores de pH. Concentrações de 1,0 mg/L desse complexo são tóxicas aos organismos de água doce. A maior contribuição para o meio ambiente, pela atividade humana, é a queima de combustíveis fósseis. Como contribuintes principais têm também os processos de mineração e fundição do metal, fusão e modelagem de ligas, indústrias de eletrodeposição e, como fontes secundárias, temos fabricação de alimentos, artigos de panificadoras, refrigerantes e sorvetes aromatizados. Doses elevadas de níquel podem causar dermatites nos indivíduos mais sensíveis e afetar nervos cardíacos e respiratórios.

3.2.9 Ferro

O ferro faz parte da composição da maioria dos sedimentos límnicos, por serem elementos muito freqüentes na superfície da Terra e, conseqüentemente, são encontrados nos corpos d'água mesmo em pequenas concentrações. Dependendo principalmente do potencial de oxi-redução, do pH e da temperatura, podem encontrar-se sob as formas reduzidas ou oxidadas. É importante na ciclagem de outros elementos como o fósforo, além de ter relevância no metabolismo de certas bactérias na redução energética do CO₂ (ESTEVEZ, 1998). O nível de ferro nas águas superficiais aumenta nas estações chuvosas devido ao carreamento de solos e a ocorrência de processos de erosão das margens. Deve-se considerar

também a contribuição de efluentes industriais, pois muitas indústrias metalúrgicas desenvolvem atividades de remoção da camada oxidada (ferrugem) das peças antes de seu uso, processo conhecido por decapagem, que normalmente é procedida através da passagem da peça em banho ácido. O ferro, apesar de não se constituir em um tóxico, traz diversos problemas para o abastecimento público de água. Confere cor e sabor à água, provocando manchas em roupas e utensílios sanitários.

3.2.10 Zinco

A presença de zinco é comum nas águas naturais, porém, em concentrações acima de 5,0 mg/L, confere à água uma aparência leitosa e produz um sabor metálico ou adstringente quando aquecida. Os efeitos tóxicos do zinco sobre os peixes são muito conhecidos, assim como sobre as algas. A ação desse íon metálico sobre o sistema respiratório dos peixes é semelhante à do níquel, anteriormente citada. As experiências com outros organismos aquáticos são escassas. É largamente utilizado na indústria e pode entrar no meio ambiente através de processos naturais e antropogênicos, entre os quais se destacam a produção de zinco primário, combustão de madeira, incineração de resíduos, produção de ferro e aço e efluentes domésticos. O zinco é também bastante utilizado em galvanoplastias na forma metálica e de sais tais como cloreto, sulfato, cianeto, etc.

3.2.11 pH

O termo pH (potencial hidrogeniônico) é usado universalmente para expressar o grau de acidez ou basicidade de uma solução, ou seja, é o modo de expressar a concentração de íons de hidrogênio nessa solução. A escala de pH é constituída de uma série de números variando de 0 a 14, os quais denotam vários graus de acidez ou alcalinidade. Valores abaixo de 7 e próximos de 0 (zero) indicam aumento de acidez, enquanto valores de 7 a 14 indicam aumento da basicidade. Por influir em diversos equilíbrios químicos que ocorrem naturalmente ou em processos unitários de tratamento de águas, o pH é um parâmetro importante em muitos estudos no campo do saneamento básico. A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies. Também o efeito indireto é muito importante, pois determinadas condições de pH podem contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos como metais

pesados; outras condições podem exercer efeitos sobre as solubilidades de nutrientes. Os critérios de proteção à vida aquática variam entre 6 a 9.

3.2.12 Turbidez

A turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la (e esta redução se dá por absorção e espalhamento, uma vez que as partículas que provocam turbidez nas águas são maiores que o comprimento de onda da luz branca), devido à presença de sólidos em suspensão, tais como partículas inorgânicas (areia, silte, argila) e de detritos orgânicos, algas e bactérias além do plâncton em geral. A erosão das margens dos rios em estações chuvosas é um exemplo de fenômeno que resulta em aumento da turbidez das águas e que exigem manobras operacionais, como alterações nas dosagens de coagulantes e auxiliares, nas estações de tratamento de águas. A erosão pode decorrer do mau uso do solo em que se impede a fixação da vegetação. Este exemplo mostra também o caráter sistêmico da poluição, ocorrendo inter-relações ou transferência de problemas de um ambiente (água, ar ou solo) para outro. Os esgotos sanitários e diversos efluentes industriais também provocam elevações na turbidez das águas. Um exemplo típico deste fato ocorre em consequência das atividades de mineração, onde os aumentos excessivos de turbidez têm provocado formação de grandes bancos de lodo em rios e alterações nos ecossistemas aquáticos. Alta turbidez reduz a fotossíntese de vegetação enraizada submersa e algas. Esse desenvolvimento reduzido de plantas pode, por sua vez, suprimir a produtividade de peixes. Logo, a turbidez pode influenciar nas comunidades biológicas aquáticas. Além disso, afeta adversamente os usos doméstico, industrial e recreacional de uma água.

3.2.13 Oxigênio dissolvido

O oxigênio proveniente da atmosfera se dissolve nas águas naturais, devido à diferença de pressão parcial. A taxa de reintrodução de oxigênio dissolvido em águas naturais através da superfície depende das características hidráulicas e é proporcional à velocidade, sendo que a taxa de reaeração superficial em uma cascata é maior do que a de um rio de velocidade normal, que por sua vez apresenta taxa superior à de uma represa, onde a velocidade é muito baixa. Outra fonte importante de oxigênio nas águas é a fotossíntese de algas. Este fenômeno ocorre em águas poluídas ou, mais propriamente, em águas eutrofizadas, ou seja, aquelas em que a decomposição dos compostos orgânicos lançados levou à liberação de sais minerais no

meio, especialmente os de nitrogênio e fósforo, que são utilizados como nutrientes pelas algas. Esta fonte não é muito significativa nos trechos iniciais de rios à jusante de fortes lançamentos de esgotos. A turbidez e a cor elevadas dificultam a penetração dos raios solares e apenas poucas espécies resistentes às condições severas de poluição conseguem sobreviver. A contribuição fotossintética de oxigênio só é expressiva após grande parte da atividade bacteriana na decomposição de matéria orgânica ter ocorrido, bem como após terem se desenvolvido também os protozoários que, além de decompositores, consomem bactérias clarificando as águas e permitindo a penetração de luz. Uma adequada provisão de oxigênio dissolvido é essencial para a manutenção de processos de autodepuração em sistemas aquáticos naturais. Os níveis de oxigênio dissolvido também indicam a capacidade de um corpo d'água natural manter a vida aquática.

3.2.14 Coliformes fecais (*Escherichia coli*)

As bactérias do grupo coliforme são consideradas os principais indicadores de contaminação fecal. O grupo coliforme é formado por um número de bactérias que inclui os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Erwenia* e enterobactérias. *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae caracterizada pela atividade da enzima glicuronidase que produz indol a partir do aminoácido triptofano. É a única espécie do grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais homeotérmicos, onde ocorre em densidades elevadas. A determinação da concentração dos coliformes assume importância como parâmetro indicador da possibilidade da existência de microorganismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifóide, febre paratifóide, desintéria bacilar e cólera.

Entre os parâmetros acima descritos os metais pesados se caracterizam em um grave problema, pois mesmo após tratamento convencional a água pode ainda estar contaminada (MACHADO *et al.*, 2005). Os metais pesados possuem ação genotóxica, mutagênica e carcinogênica em animais incluindo a espécie humana (VON BURG e LIU, 1993; STOHS e BAGCHI 1995; MOUNT e HOCKETT, 2000). Segundo resolução do CONSEMA nº 128, de 2006, o valor máximo permitido em lançamentos de efluentes industriais para os parâmetros de cromo total, chumbo e níquel é 0,5 mg/L, 0,2 mg/L e 1,0 mg/L, respectivamente.

A resolução CONAMA nº357, de 2005, define como cinco as classes possíveis para as águas doces superficiais, tendo como critério para esta classificação os parâmetros máximos ou mínimos, quando for o caso, permitidos para cada classe (Tabela 1).

Tabela 1 - Classes de água doce e seus usos de acordo com a resolução CONAMA 357/2005.

Classificação	Usos
Classe especial	Abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
Classe 1	Abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme a resolução CONAMA nº 274, de 2000; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.
Classe 2	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme resolução CONAMA nº 274, de 2000; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto e à aquicultura e à atividade de pesca.
Classe 3	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário e à dessedentação de animais.
Classe 4	Navegação e harmonia paisagística.

Além dos parâmetros estabelecidos pela resolução 357 do CONAMA, a Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM) utiliza também o Índice de Qualidade de Água (IQA) que adota as faixas de qualidade de água. Este índice utiliza parâmetros (variáveis) considerados mais representativos para a caracterização da qualidade das águas: oxigênio dissolvido, nitrato, fósforo total, temperatura da água, turbidez, e sólidos totais. A cada variável é atribuído um peso, de acordo com a sua importância relativa no cálculo do IQA, e traçadas curvas médias de variação da qualidade das águas em função da concentração do

mesmo. Os valores variam de 0 a 100 (muito ruim a excelente). Desta forma o IQA reflete a interferência por esgotos sanitários e outros materiais orgânicos, nutrientes e sólidos.

3.3 Características da área de estudo

3.3.1 Bacia Hidrográfica do rio Caí

A Bacia Hidrográfica do rio Caí (Figura 1) possui uma área de 5.057,25 Km², correspondendo a 1,79 % da área do Estado do Rio Grande do Sul, localizada ao norte de Porto Alegre, entre o planalto brasileiro e a depressão central. Seu curso d'água tem uma extensão de 285 Km. Ao todo 41 municípios, com toda ou com parte de sua área, compõem a bacia. A população total da bacia é de 383.929 habitantes, sendo em torno de 25 % moradores da área rural e 75 % da área urbana (FEPAM/GTZ - 1997).

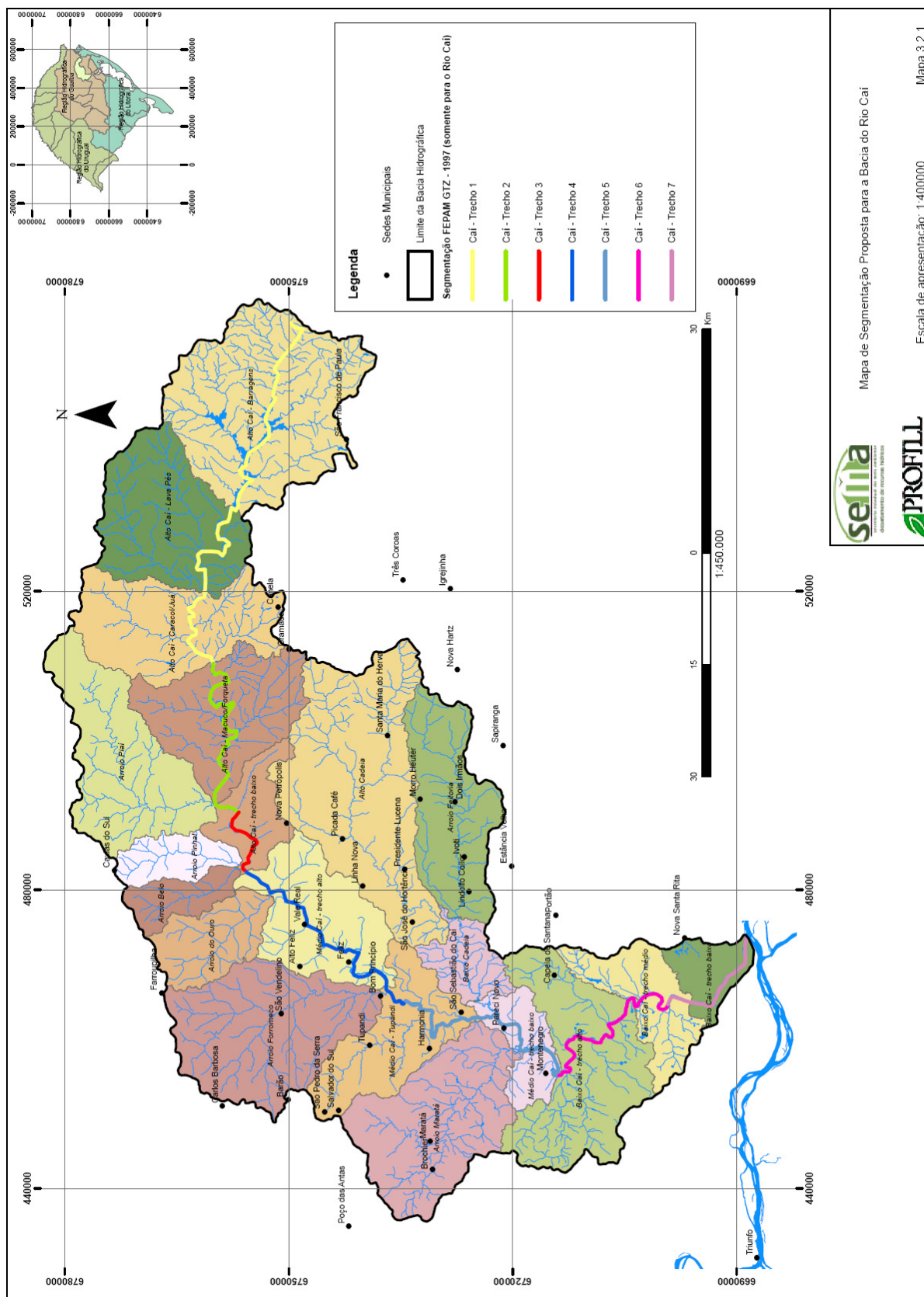


Figura 1 – Mapa da Bacia Hidrográfica do rio Cai.

A atividade econômica predominante da bacia é a agricultura, embora a indústria e o comércio sejam as atividades que geram mais divisas. Entre os municípios com atividade industrial bastante desenvolvida destacam-se os municípios de Caxias do Sul e Farroupilha, localizados na serra, com indústrias de alto potencial poluidor, principalmente do ramo de metalurgia e metal-mecânica. Na região mais plana da bacia, principalmente na sub-bacia do rio Cadeia, os curtumes são as indústrias de maior potencial poluidor hídrico.

Segundo FEPAM/GTZ (1997), as águas do rio Caí e seus afluentes têm usos bastante diversificados sendo que todo o rio pode ser utilizado para a proteção das comunidades aquáticas e harmonia paisagística. Cada trecho do rio possui um potencial diferenciado o que gera usos também diferenciados:

Curso Superior: Energia elétrica, recreação, abastecimento público e diluição de esgoto.

Curso Médio: Irrigação, recreação (este trecho do rio é o que apresenta maior concentração de balneários, localizados principalmente nos afluentes do rio Caí), diluição de despejos domésticos e industriais (a maioria dos despejos domésticos dos municípios é lançada em esgotos pluviais e depois nos recursos hídricos, sem tratamento), mineração (principalmente, argila, areia, cascalho, arenito e basalto) e abastecimento doméstico e industrial.

Curso Inferior: Irrigação, navegação, recreação, abastecimento público e industrial, mineração (argila, areia e cascalho) e diluição de despejos domésticos e industriais. Nenhum município, neste trecho, trata seus esgotos cloacais. Quanto às indústrias, destacam-se os curtumes localizados ao longo do rio Cadeia/Feitoria e o Pólo Petroquímico.

Segundo a FEPAM, o rio Caí em geral apresenta boa qualidade das águas, mas alguns arroios drenam áreas poluídas causando reflexos na foz destes arroios. Destaca-se o rio Cadeia, cujo afluente arroio Feitoria drena alguns curtumes dos municípios de Ivoti e Linolfo Collor, e também o arroio Pinhal que drena a área sul de Caxias do Sul.

Alguns fatores topográficos favorecem a qualidade das águas do rio Caí, dos quais se destacam: a ausência de grandes municípios próximos de suas margens, presença de corredeiras especialmente no trecho superior e baixas temperaturas. Os grandes municípios da bacia hidrográfica como Caxias do Sul e Farroupilha estão afastados do rio Caí e o trabalho

de depuração é realizado nos arroios e rios que drenam parte destes municípios, como arroio Pinhal (área sul de Caxias do Sul), rio Cadeia (curtumes de Ivoti e Lindolfo Collor), arroio Forromeco (área sul de Farroupilha).

3.3.2 Sub-bacia do rio Cadeia

O rio Cadeia, pertencente à Bacia Hidrográfica do rio Caí, é um dos formadores da Bacia do rio Guaíba, às margens do qual se situa Porto Alegre, capital do estado do Rio Grande do Sul. O rio Cadeia é o principal afluente do rio Caí, drenando cerca de 19% da área da bacia, nos quais se encontram vários municípios importantes, destacando-se Nova Petrópolis, Gramado, Dois Irmãos, Morro Reuter, Santa Maria do Herval, Ivoti e Portão.

A sub-bacia do rio Cadeia (Figura 2) possui uma área de mata nativa/reflorestamento de 495,41 Km², o que representa 55,24 % de toda a sub-bacia, enquanto que a área urbana corresponde a 15,07 Km² e a área ocupada pela agricultura é de 248,34 Km², referente a 27,69 % do total da sub-bacia. As principais culturas são o milho (9.700 ha), laranja (7.800 ha), mandioca (4.200 ha), e batata inglesa (3.700 ha), estimando-se preliminarmente em 70.000 litros o volume de agrotóxicos lançado no ambiente por ano.

Conforme monitoramento executado pela FEPAM trimestralmente na Bacia Hidrográfica do rio Caí, no período de 1992 a 2007, com base nas médias anuais, as águas da foz do rio Cadeia (S 29° 37' 48,6" W 51° 22' 45,5") enquadraram-se na faixa regular não evidenciando tendências. Os dados mostraram que a foz do rio Cadeia apresentou frequência igual a 85% na classe 1 no parâmetro oxigênio dissolvido e 100% de frequência na classe 1 quanto a DBO₅. Quanto ao parâmetro coliformes termotolerantes em 66% enquadrou-se na classe 3.

Em um estudo realizado por VARGAS *et al.* (2007), as águas do rio Cadeia apresentaram potencial citotóxico e mutagênico no ensaio *Salmonella*/microsoma, porém, o trecho avaliado encontra-se no município a jusante da área de estudo do presente trabalho. TAGLIARI *et al.* (2006) analisaram no inverno de 2000 e no verão de 2002 o mesmo trecho do rio Cadeia aqui estudado encontrando indícios de mutagenicidade utilizando TA102, na ausência e presença de S9mix, em amostras de verão.

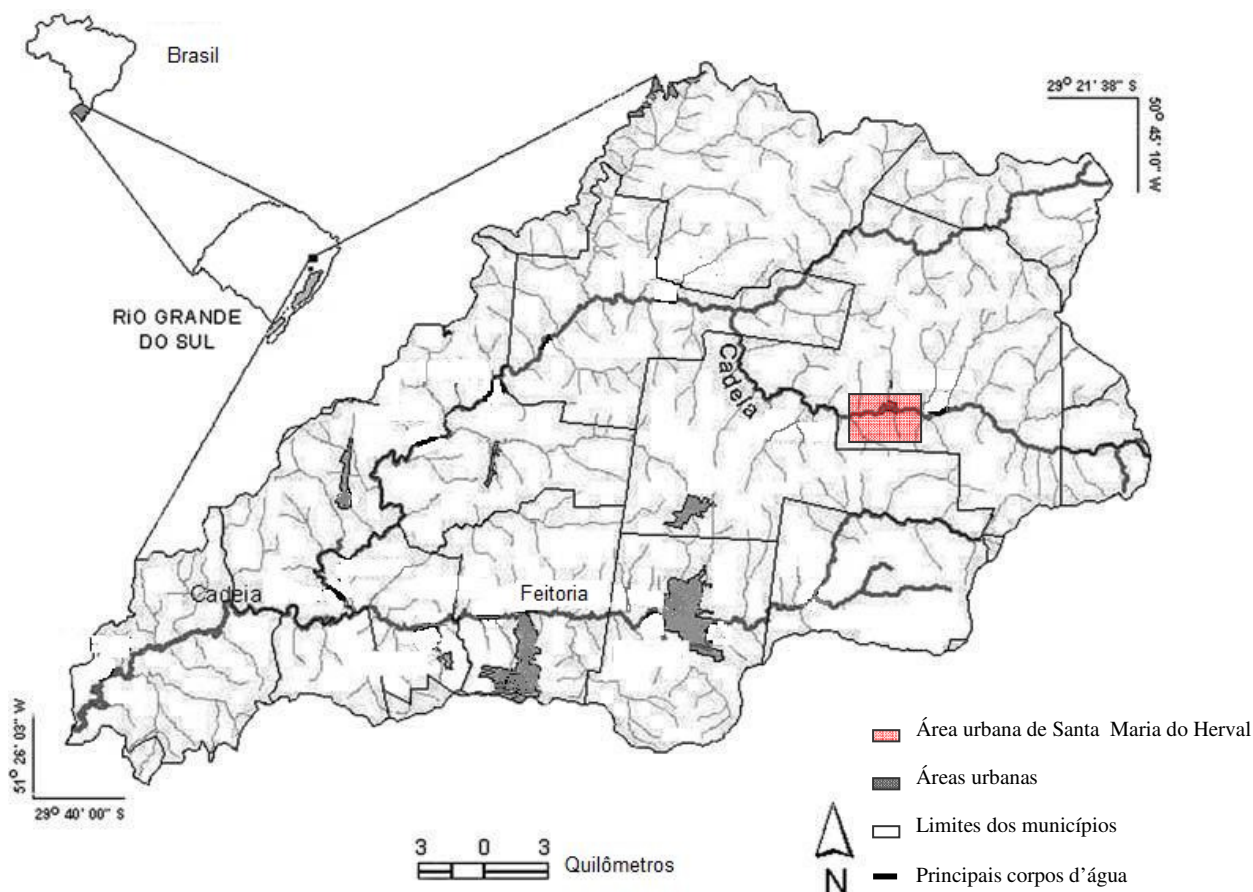


Figura 2 – Mapa da sub-bacia do rio Cadeia com a área urbana de Santa Maria do Herval em destaque. Adaptado de RODRIGUES e FORMOSO (2005).

3.3.3 Município de Santa Maria do Herval

O trecho do rio Cadeia estudado no presente trabalho situa-se no trecho intermediário da Bacia do rio Caí, considerado como Alto Cadeia, no município de Santa Maria do Herval/RS (Figura 3). Santa Maria do Herval localiza-se a uma latitude $29^{\circ}29'53''$ sul e a uma longitude $50^{\circ}59'34''$ oeste, estando a uma altitude de 371 metros. O clima é do tipo Cfa - Subtropical úmido (Köppen). A precipitação varia entre 1200 a 2100 mm/ano.

A área total do município é de 134,53 Km², sendo que 97,55% dessa área e 100% da área urbana localizam-se dentro da sub-bacia do rio Cadeia. A área urbana corresponde a 20 Km² enquanto que a rural a 114,53 Km². A população total em 2004 era de 6.152 habitantes sendo que o número de habitantes na área urbana era de 1.582 e na área rural de 4.507. O município possui 1059,03 ha de área de preservação das quais 37,58% encontra-se em estado de desmatamento e 62,41% ainda apresenta mata. A economia de Santa Maria do Herval está baseada na indústria calçadista e na agricultura, além de um frigorífico e do setor de serviços.

As atividades rurais são uma das principais fontes potenciais de poluição. Estima-se que a produção de milho no município corresponda a 1.000 ha, a de mandioca a 150 ha e a de batata a 2.100 ha. Santa Maria do Herval possui também 192.550 ha de produção de animais de pequeno porte e 6.100 ha de grande porte. Quanto à vazão industrial o setor de couro, peles e similares lança 15m³/dia de efluentes no rio Cadeia (KOTLHAR e DE LUCA, 1997).



Figura 3 - Mapa da localização do município de Santa Maria do Herval no estado do Rio Grande do Sul.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo, locais e períodos de coleta

Foram demarcados três pontos (A, B, C,) ao longo do trecho escolhido do rio Cadeia no município de Santa Maria do Herval/RS (Figura 4). O ponto A (S 29°31'01,6", W 50°54'52,6") situa-se na zona rural do município, onde em alguns locais visualizam-se plantações próximas a beira do rio. Entretanto, a jusante deste ponto pode existir outras fontes de contaminação, além da agropecuária, a partir de municípios mais próximos à nascente do rio (Igrejinha, por exemplo). O ponto B (S 29°30'10,8", W50°58'26") localiza-se a montante do ponto A, dentro do Balneário Amizade, no início da área urbana. E o ponto C (S 29°30'04,9', W 51°00'05,9") localiza-se a montante do ponto B na represa da Usina Hidrelétrica do Herval, após todo o perímetro urbano do município. Os pontos A e B, por apresentarem alta declividade, o que gera movimentação das águas, são considerados corpos d'água lóticos, e o ponto C é considerado lântico por apresentar águas com movimentos lentos ou estagnado.

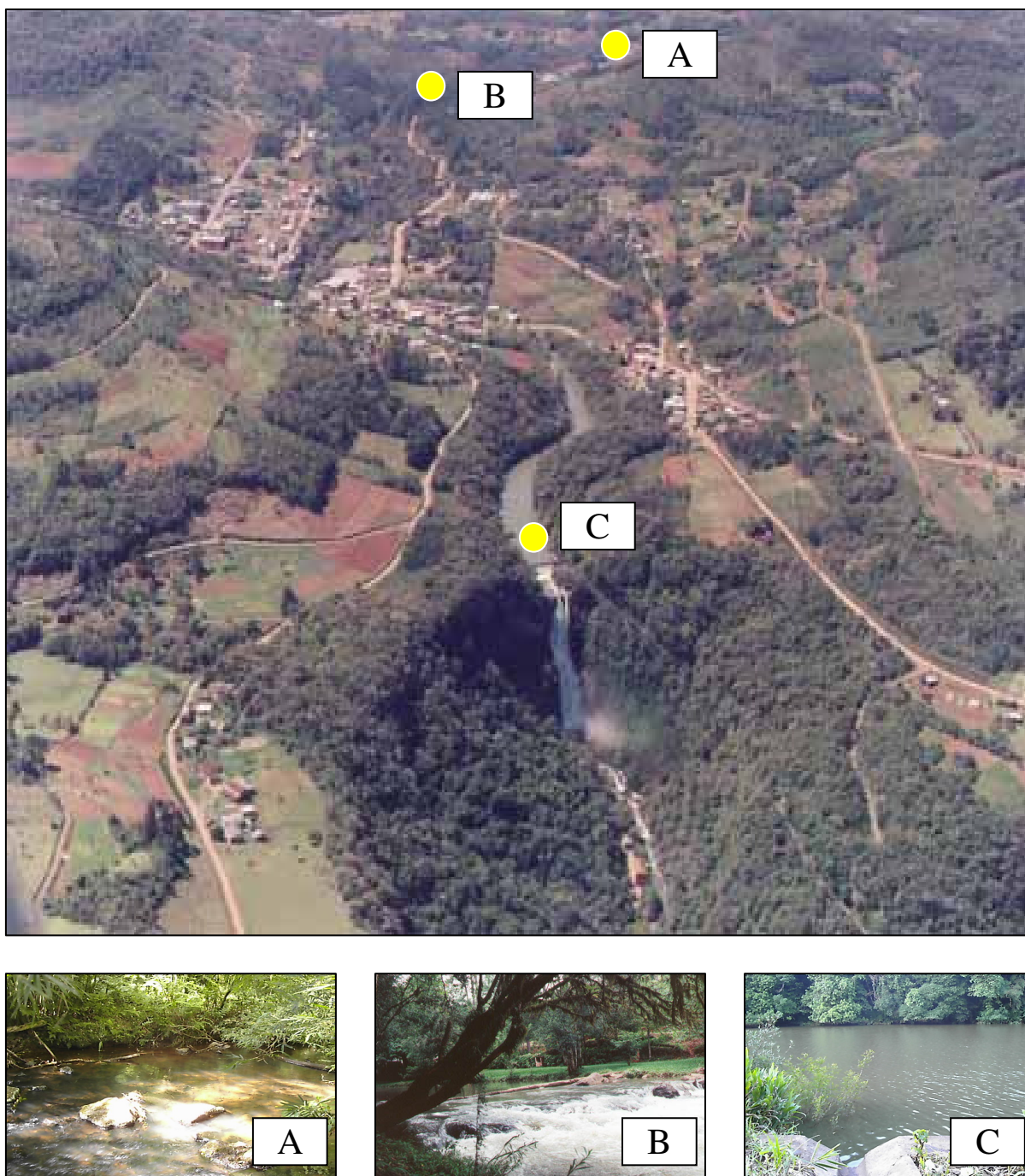


Figura 4 - Esquema dos pontos de coleta (A, B, C) no rio Cadeia em Santa Maria do Herval. O ponto A localiza-se antes do centro urbano e na área rural do município; o ponto B localiza-se no centro do município no Balneário Amizade; o ponto C localiza-se após todo o perímetro urbanizado do município, na Usina Hidrelétrica Herval.

Em cada ponto foram coletadas amostras de água que foram encaminhadas à Feevale, para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular para a realização dos bioensaios com peixes e para a Central Analítica para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas da água. Em um período diferente (sempre que possível, em intervalos de aproximadamente sete dias em relação às coletas de amostras de água), foram realizadas coletas de peixes apenas nos pontos B e C. Foram realizadas várias tentativas de coleta de peixes no ponto A, mas sem sucesso, possivelmente devido à baixa profundidade daquele trecho do rio. As amostragens ocorreram periodicamente visando detectar possíveis variações durante o período de 12 meses, compreendidos entre novembro de 2007 e outubro de 2008. Dados climatológicos da região referentes aos meses de coleta foram obtidos junto a METSUL meteorologia do município de São Leopoldo/RS (Tabela 2). Outubro, agosto e setembro de 2008 foram os meses que apresentaram maiores índices pluviométricos enquanto que junho de 2008, novembro de 2007 e fevereiro de 2008 apresentaram os menores índices pluviométricos em ordem decrescente.

Tabela 2 - Dados climatológicos da região de estudo nos meses de coleta obtidos juntos a METSUL Meteorologia.

	Precipitação total (mm)	Umidade relativa do ar (média)	Dias chuvosos	Temperatura média (°C)	Temperatura mínima absoluta (°C)	Temperatura máxima absoluta (°C)
Novembro/07	100,2	70%	8	21,9	9,9	36,1
Fevereiro/08	84,9	74%	9	24,5	14	35,4
Junho/08	133,4	82%	14	15,0	1,9	24,2
Agosto/08	185,3	77%	11	15,8	5,1	31,0
Setembro/08	162,2	76%	10	16,8	6,2	33,9
Outubro/08	217,9	74%	15	19,9	7,8	35,1

4.2 Metodologia

4.2.1 Ensaio cometa

4.2.1.1 Bioensaios

Foram realizadas três coletas de água nos pontos A, B e C do rio Cadeia: novembro de 2007, fevereiro de 2008 e outubro de 2008. Para cada coleta, exemplares de *Astyanax jacuhiensis* (Lambari) provenientes de piscicultura foram transferidos para o Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário FEEVALE, onde ocorreu a aclimação por

aproximadamente 24 horas em aquários de 9 litros, contendo água de poço artesiano com aeração e a temperatura ambiente. Após o período de aclimação os animais foram então expostos às amostras de águas no mesmo dia em que foram realizadas as coletas. Para cada ponto de coleta foi utilizado um aquário, o qual continha 9 litros de água do rio. Em cada aquário, cerca de 10 exemplares de *Astyanax jacuhiensis*, medindo aproximadamente 5 cm, ficaram expostos durante 48 horas até a realização do ensaio cometa.

4.2.1.2 Preparação das lâminas e análise microscópica

Após o período de exposição os animais foram então retirados dos aquários individualmente e com um corte na região caudal foi coletada uma amostra de 5 µl de sangue. A realização do ensaio cometa seguiu a metodologia descrita por TICE *et al.* (2000), utilizando a coloração com nitrato de prata. A amostra de 5 µl de sangue coletada de cada peixe foi misturada a 95 µl de agarose “low-melting”. Após homogeneização, a suspensão de células foi colocada em uma lâmina previamente coberta com agarose regular, sobre a qual foi colocada uma lamínula. As lâminas foram deixadas em câmara úmida a 4°C por cerca de 7 minutos, posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% de Triton X-100, 10% de DMSO) com altos níveis de sais e detergente por no mínimo 6 horas e no máximo 96 horas. Quando retiradas da lise, as lâminas foram acondicionadas em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão alcalina (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH > 13) por 20 minutos. Após este período, foi realizada a eletroforese a 25V e 300mA, também por 20 minutos. Ao término do processo de eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e imersas em tampão de neutralização (Tris 0.4M com pH 7,5). Para a coloração, as lâminas foram imersas em solução fixadora (15% ácido tricloroacético, 5% sulfato de zinco, 5% glicerol e 75% água destilada), lavadas em água destilada, secas e então acomodadas em cubeta contendo nitrato de prata. Após 35 minutos, foram retiradas da cubeta, lavadas em água corrente, e colocadas para secar novamente, para então serem analisadas.

Para medir o dano de DNA através do ensaio cometa, 100 células de cada lâmina foram observadas em microscópio óptico de luz (Nikon) utilizando aumento de 400X. As lâminas foram codificadas e sempre analisadas pela mesma pessoa.

As células foram classificadas de acordo com o tamanho da “cauda” em (Figura 5):

Classe 0: nenhum dano, ou seja, nucleóides intactos, sem cauda.

Classe 1: dano pequeno, os nucleóides apresentam um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça;

Classe 2: dano intermediário, os nucleóides apresentam caudas com tamanhos equivalentes a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça;

Classe 3: dano elevado, os nucleóides apresentam caudas com tamanho equivalente a duas vezes o diâmetro da cabeça;

Classe 4: dano máximo, os nucleóides apresentaram caudas com tamanho superior a duas vezes o diâmetro da cabeça.

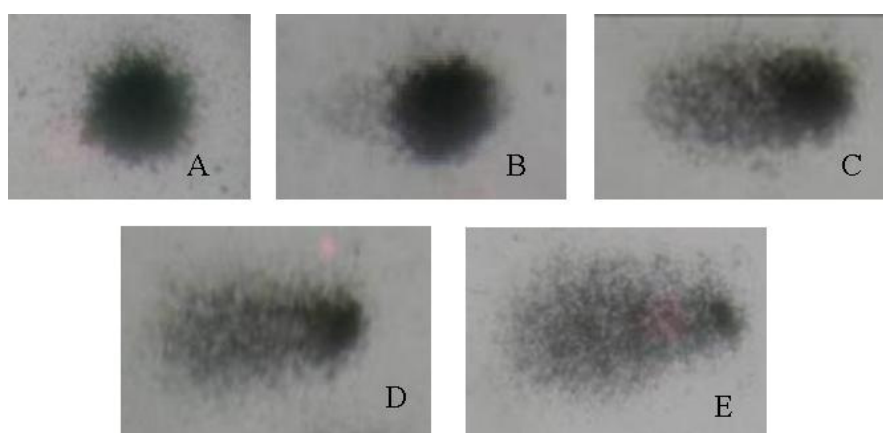


Figura 5 - Classes de danos de DNA utilizadas no ensaio cometa. A- Classe 0 ; B - Classe 1; C- Classe 2; D - Classe 3; E - Classe 4.

A avaliação do dano de DNA entre os pontos de uma coleta e entre as coletas de um mesmo ponto foi realizada com base em três parâmetros de genotoxicidade fornecidos pelo ensaio cometa: 1) a frequência de células com dano (frequência de dano) onde foram somados os números de células pertencentes às classes 1, 2, 3 e 4; 2) a frequência de cada classe de dano; 3) o índice de dano, estimado com base na multiplicação do número de células obtidas em cada classe pelo valor de cada classe, obtendo-se assim o escore, de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de dano: } (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)$$

Onde, A, B, C, D e E são os números de células encontradas para cada categoria analisada. Assim, o índice de dano poderia variar de 0 a 400.

4.2.2 Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares

4.2.2.1 Coleta dos peixes

As coletas foram realizadas em 2008, nos meses de fevereiro, junho, agosto e outubro. Foram coletados, com auxílio de puçá, exemplares pertencentes à espécie *Bryconamericus iheringi* (Lambari) medindo cerca de 7 cm nos pontos B e C do rio Cadeia. Os exemplares foram transportados em recipientes contendo água do rio ao laboratório de Genética e Biologia Molecular da Feevale para a realização do teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.

4.2.2.2 Preparação das lâminas e análise microscópica

O sangue foi coletado a partir de um corte na região caudal e diretamente gotejado em uma lâmina limpa e seca e com auxílio de uma outra lâmina encostada em ângulo de 45°, o sangue foi espalhado uniformemente, formando uma camada delgada. Após 10 minutos de secagem a temperatura ambiente as lâminas então foram fixadas com metanol absoluto por 10 minutos. Após 10 minutos de secagem, as lâminas foram então coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8 (4,0827g KH_2PO_4 ; 7,099g Na_2HPO_4 para 1L de água) também por 10 minutos. Após este período as lâminas foram lavadas com água destilada e armazenadas em caixas em temperatura ambiente para posterior análise. Foi preparada uma lâmina para cada peixe. A análise citológica foi realizada em microscópio óptico de luz (Nikon) com lente de imersão (1000X). Foram analisados 2000 eritrócitos intactos por lâmina, o que significa 2000 eritrócitos por peixe amostrado.

Foram considerados como micronúcleos os corpúsculos de massa de cromatina que em relação ao núcleo apresentaram aproximadamente 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência (AL-SABTI e METCALFE, 1995) (Figura 6 – MN).

As anormalidades nucleares foram analisadas segundo critérios de CARRASCO *et al.* (1990). Os brotos nucleares caracterizam-se pela ligação do micronúcleo ao núcleo (Figura 6 – BRN) e os eritrócitos binucleados pela presença de dois ou mais núcleos (Figura 6 - BN). Núcleos com morfologia anormal foram considerados como: “blebbed”, apresentam uma pequena invaginação da membrana e da cromatina (Figura 6 - BL); “lobed”, apresentam uma invaginação maior da membrana e da cromatina, formando lobos (Figura 6 - LB) e “notched”,

apresentam profundas invaginações ou ainda lacunas que não contém cromatina (Figura 6 – NT).

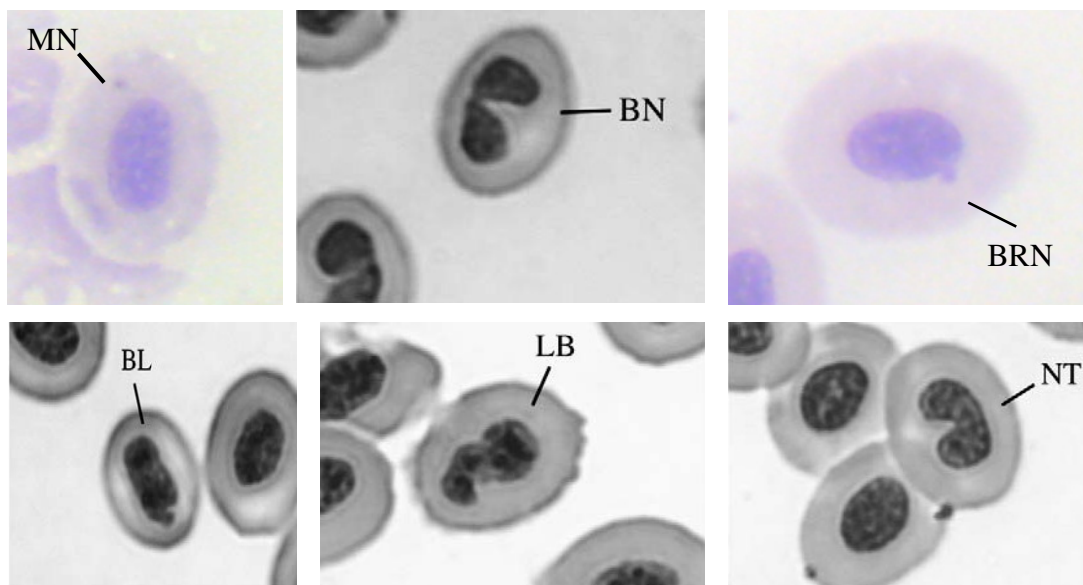


Figura 6 – A: MN: Micronúcleo; BN: Eritrócito binucleado; BRN: Broto nuclear; BL: Núcleo “blebbed”; LB: Núcleo “lobed”; NT: Núcleo “notched”. (BN, BL, LB, NT imagens de JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2008).

4.2.3 Análise físico-química e microbiológica da água

4.2.3.1 Coleta de água

Foram coletadas amostras de água nos três pontos selecionados no rio Cadeia em novembro de 2007, fevereiro de 2008, junho de 2008 e setembro de 2008.

As amostras de água foram coletadas em frascos de polietileno, com capacidade de 5L para os parâmetros de pH, turbidez, DBO₅ (demanda bioquímica de oxigênio), nitrogênio amoniacal total nitrito e nitrato. Para a determinação dos parâmetros de fósforo total foi utilizado um frasco separado de 250 mL. Para os metais como alumínio, chumbo, cromo, cobre, níquel, ferro e zinco foram utilizados frascos com capacidade de 1 L, previamente preparados para tal finalidade. Para a amostra de coliformes fecais foram utilizadas embalagens próprias para tal uso, previamente esterilizadas e a coleta se deu de forma direta. As amostras para determinação de oxigênio dissolvido foram coletadas diretamente, em frascos adequados, preservadas no momento da coleta com 1 mL de solução de sulfato manganoso e 1 mL de solução de iodeto de potássio alcalino.

Todas as amostras foram acondicionadas em recipiente térmico preservadas com gelo e transportadas até a Central Analítica do Centro Universitário Feevale em até três horas, para então serem analisadas.

4.2.3.2 Análise laboratorial

Especificamente foram analisados os parâmetros de qualidade de água: DBO₅, nitrogênio amoniacal, fósforo total, alumínio, chumbo, cromo, cobre, níquel, ferro, zinco, pH, nitrato, nitrito, turbidez, oxigênio dissolvido e coliformes fecais (*Escherichia coli*). As análises foram realizadas pela Central Analítica da Feevale, segundo metodologia e procedimento conforme credenciamento a Fundação Estadual de Proteção de Meio Ambiente (FEPAM) (Tabela 3). As análises físico-químicas foram realizadas em duplicata, tendo como referência o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 21th Ed, 2005.

Tabela 3 - Metodologia e procedimentos utilizados nos ensaios laboratoriais para cada parâmetro segundo FEPAM.

Parâmetro	Metodologia	Procedimento
DBO ₅	Manometria	PT.PA.004
Nitrogênio amoniacal total	Titulometria	PT.PA.011
Fósforo total	Espectroscopia UV/VIS	PT.PA.008
Alumínio	Absorção atômica	PT.AA.001
Chumbo	Absorção atômica	PT.AA.001
Cromo	Absorção atômica	PT.AA.001
Cobre	Absorção atômica	PT.AA.001
Níquel	Absorção atômica	PT.AA.001
Ferro	Absorção atômica	PT.AA.001
Zinco	Absorção atômica	PT.AA.001
pH	Potenciometria	PT.PA.028
Nitrato	Espectroscopia UV/VIS	PT.PA.009
Nitrito	Espectroscopia UV/VIS	PT.PA.010
Turbidez	Nefelometria	PT.PA.031
Oxigênio dissolvido	Winkler/Azida	PT.PA.035
Coliformes fecais (<i>Escherichia coli</i>)	Substrato enzimático	PT.MB.005

A análise desses parâmetros junto com a sua comparação com os valores de referência da Resolução 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), foi utilizada para a determinação da classe de qualidade da água de cada coleta em cada ponto de amostragem do rio Cadeia. Os valores de referência para a classificação das águas coletadas nos diferentes pontos do rio Cadeia estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de referência para a classificação das amostras de água analisadas (segundo Resolução 357/2005 do CONAMA).

Parâmetro	Unidade	Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4	Fora de classe
DBO ₅	mg O ₂ L ⁻¹	3		5		10		NE	---
Nitrogênio amoniacal total	mg L ⁻¹	N	pH	N	pH	N	pH	NE	---
		3,7	≤7,5	3,7	≤7,5	13,3	≤7,5		
		2,0	>7,5≤8,0	2,0	>7,5≤8,0	5,6	>7,5≤8,0		
		1,0	>8,0≤8,5	1,0	>8,0≤8,5	2,2	>8,0≤8,5		
		0,5	>8,5	0,5	>8,5	1,0	>8,5		
Fósforo total	mg L ⁻¹	F	Ambiente	F	Ambiente	0,15	Ambiente	NE	---
		0,020	Léntico	0,020	Léntico	0,05	Léntico		
		0,025	Intermed.	0,025	Intermed.	0,075	Intermed.		
		0,1	Lótico	0,1	Lótico	0,15	Lótico		
Alumínio	mg L ⁻¹	0,1		0,1		0,2		NE	---
Chumbo	mg L ⁻¹	0,01		0,01		0,033		NE	---
Cromo	mg L ⁻¹	0,05		0,05		0,05		NE	---
Cobre	mg L ⁻¹	0,009		0,009		0,013		NE	---
Níquel	mg L ⁻¹	0,025		0,025		0,025		NE	---
Ferro	mgL ⁻¹	0,3		0,3		5,0		NE	---
Zinco	mg L ⁻¹	0,18		0,18		5		NE	---
pH	Unidades de pH	6 a 9		6 a 9		6 a 9		6 a 9	<6>9
Nitratos	mg L ⁻¹	10		10		10		NE	---
Nítrito	mg L ⁻¹	1,0		1,0		1,0		NE	---
Turbidez	NTU	40		100		100		NE	---
Oxigênio dissolvido	Mg O ₂ L ⁻¹	**6		**5		**4		**2	<2
Coliformes fecais (<i>E. coli</i>)	NMP/100 mL	200		1000		2500		NE	>1,7x10 ⁵

Valores antecidos por ** correspondem a valores mínimos; os demais são valores máximos.

4.2.4 Análise estatística

A comparação entre os índices de danos de DNA do ensaio cometa e frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares entre os diferentes pontos e períodos de coleta foram realizadas com base na Análise de Variância - ANOVA ($p < 0,05$) e teste de Tuckey *a posteriori*, ou teste T Student quando a análise envolvia duas amostras. A comparação das frequências de células com dano, assim como das classes de dano do ensaio cometa entre os pontos e períodos foram realizadas através do teste do Qui-quadrado (χ^2). Todas as análises foram feitas no programa SPSS 10.0.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio cometa

Neste estudo, foram analisados 44 exemplares de *Astyanax jacuhiensis* através do ensaio cometa, em três períodos de coleta distintos, totalizando 8 amostras do rio Cadeia (o ponto B não foi avaliado na coleta de novembro de 2007).

A comparação da frequência de células que apresentavam dano de DNA (frequência de dano, isto é, o somatório das classes 1, 2, 3 e 4) entre os pontos em uma mesma coleta não apresentou diferenças significativas (Tabela 5), sendo que a maior diferença neste parâmetro de genotoxicidade em um mesmo período de coleta foi observada em outubro/08 (66% no ponto A e 79% no ponto C). Considerando todas as amostras analisadas, a frequência de dano variou de 66% (ponto A, coleta outubro/08) a 92% (ponto A, coleta fevereiro/08). Ao comparar as frequências de dano entre períodos de coleta dentro de um mesmo ponto, os pontos A ($p=0,001$) e C ($p=0,019$) apresentaram diferença significativa. O ponto A apresentou maior média de frequência de dano (92%) em fevereiro de 2008 diferindo significativamente de outubro de 2008 (66%). O ponto C apresentou maior média também em fevereiro de 2008 (91%) diferindo significativamente de novembro de 2007 (70%) (Tabela 5).

Tabela 5 – Média \pm desvio padrão da frequência de células com dano de DNA no ensaio cometa em *Astyanax jacuhiensis* e número de indivíduos analisados (entre parênteses) nos pontos A, B e C nas três coletas do rio Cadeia. Valores de p para as comparações entre as coletas em um mesmo ponto são apresentados na última coluna e na última linha para as comparações entre os pontos em uma mesma coleta.

Pontos de coleta	Coletas			p (entre coletas)
	Novembro/07	Fevereiro/08	Outubro/08	
A	0,81 \pm 0,04 ^{a, b} (5)	0,92 \pm 0,10 ^b (6)	0,66 \pm 0,13 ^a (6)	p=0,001
B	-	0,80 \pm 0,13 (4)	0,76 \pm 0,04 (5)	p=0,07
C	0,70 \pm 0,18 ^a (4)	0,91 \pm 0,08 ^b (8)	0,79 \pm 0,09 ^{a, b} (6)	p=0,019
p (entre pontos)	p = 0,20	p = 0,14	p = 0,08	

Meses de coleta com a mesma letra não diferem significativamente dentro do mesmo ponto (Teste ANOVA, Tuckey *a posteriori*).

As comparações da distribuição das frequências de cada classe de dano do ensaio cometa entre os pontos de uma mesma coleta apresentaram diferença significativa em todas as coletas (Tabela 6). No mês de novembro de 2007 no ponto A, a classe de dano com maior frequência foi a 3 (24,20%) e a com menor frequência foi 1 (15,40%) enquanto que no ponto C a classe 0 apresentou a maior frequência (29,75%) e a classe 1 a menor (16,00%). Em fevereiro de 2008, a classe de dano mais freqüente foi a 4 nos três pontos de coleta (30,00% no ponto A; 22,25% no ponto B e 45,25% no ponto C), entretanto a distribuição das frequências de cada classe foi significativamente heterogênea entre os pontos. Na última coleta, do mês de outubro/08, o ponto A apresentou maior frequência da classe 0 (33,70%) e a menor da classe 4 (2,5%). No ponto B, a maior frequência foi encontrada na classe 2 (27,80%) e a menor na classe 4 (6,20%). E no ponto C, a maior frequência obtida foi na classe 2 (27,30%) e a menor na classe 3 (18,70%).

Tabela 6 - Frequência das classes de dano do ensaio cometa em *Astyanax jacuhiensis* nos pontos A, B e C do rio Cadeia em cada período de amostragem.

Coleta	Ponto de coleta (N)	Classes				
		0	1	2	3	4
Novembro/07	A (5)	(19,40%)	(15,40%)	(21,60%)	(24,20%)	19,40%
	C (4)	(29,75%)	(16,00%)	(16,50%)	(21,00%)	(16,75%)
		$\chi^2 = 14,8; p=0,005^a$				
Fevereiro/08	A (6)	(8,20%)	(12,80%)	(22,50%)	(26,50%)	(30,00%)
	B (4)	(20,50%)	(16,75%)	(20,25%)	(20,25%)	(22,25%)
	C (8)	(9,40%)	(15,00%)	(11,75%)	(18,60%)	(45,25%)
		$\chi^2 = 120,3; p=0,001^a$				
Outubro/08	A (6)	(33,70%)	(26,30%)	(22,70%)	(14,80%)	(2,50%)
	B (5)	(23,60%)	(22,20%)	(27,80%)	(20,20%)	(6,20%)
	C (6)	(21,00%)	(20,20%)	(27,30%)	(18,70%)	(12,80%)
		$\chi^2 = 79,1; p=0,002^a$				

^a Teste de homogeneidade da distribuição das classes de dano entre os pontos na mesma coleta (Teste do Qui-quadrado – χ^2).

Os resultados da análise do índice de dano de DNA do ensaio cometa entre os pontos de uma mesma coleta são apresentados na Tabela 7. Na coleta de novembro/07 não houve diferença significativa ($p=0,53$) entre os pontos A (índice médio = 208,80) e C (índice médio = 179,00). O mês de fevereiro de 2008 apresentou diferença significativa ($p=0,02$) quanto a este parâmetro de genotoxicidade, no qual o ponto B apresentou índice de dano significativamente menor (207,00) do que os pontos A (257,16) e C (275,37). Em outubro/08, foi observada uma tendência de aumento do índice de dano do ponto A em direção ao ponto C, porém não foram observadas diferenças significativas entre os pontos (índice médio = 126,16; 163,00 e 182,00 para os pontos A, B e C, respectivamente).

Ao comparar as variações entre os índices de dano de DNA de um mesmo ponto entre as diferentes coletas (Tabela 7) foi observado que no ponto A o mês de fevereiro de 2008 foi

significativamente maior ($p=0,0001$) do que a coleta de outubro de 2008. O ponto B não apresentou diferença significativa entre as coletas de fevereiro e outubro de 2008 ($p=0,17$). O ponto C apresentou resultados semelhantes ao ponto A, o maior índice de dano de DNA ocorreu em fevereiro de 2008 diferindo significativamente com todos os outros meses de amostragem ($p=0,0001$).

Tabela 7 – Média e desvio padrão do índice de danos de DNA em *Astyanax jacuhiensis* e número de indivíduos analisados (N) nos pontos A, B e C do rio Cadeia, nos períodos de coleta novembro/2007, fevereiro/2008 e outubro/2008. Valores de p para as comparações entre as coletas em um mesmo ponto são apresentados na última coluna e na última linha para as comparações entre os pontos em uma mesma coleta.

Pontos	Coletas			p
	Novembro/07	Fevereiro/08	Outubro/08	
A	208,80 ± 21,50 ^{a, b} (5)	257,16 ± 42,90 ^b (6)	126,16 ± 43,60 ^a (6)	p=0,0001
B	-	207,00 ± 44,2* (4)	163,00 ± 41,81 (5)	p=0,17
C	179,00 ± 78,70 ^a (4)	275,37 ± 28,72 ^b (8)	182,00 ± 32,90 ^a (6)	p=0,0001
p	p=0,53	p=0,02	p=0,07	

Períodos de coleta com a mesma letra não diferem significativamente dentro do mesmo ponto.

* Dano no ponto B difere significativamente dos demais pontos na coleta de Fev/08. (Teste ANOVA, Tuckey *a posteriori*).

5.2 Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares

Os resultados do teste de micronúcleos (MN) são apresentados na Tabela 8. O número médio de células com MN em 2.000 células analisadas de *Bryconamericus iheringi* não apresentou diferenças significativas entre os pontos B e C do rio Cadeia nas coletas de fevereiro de 2008 ($p=0,23$), junho de 2008 ($p=0,55$), agosto de 2008 ($p=1,0$) e outubro de 2008 ($p=0,23$). Quando a taxa de MN foi comparada entre os períodos de coleta, o ponto C não apresentou diferenças significativas ($p=0,07$). No entanto, houve diferença significativa ($p=0,01$) entre as amostras do ponto B, sendo que os peixes analisados no mês de fevereiro/08 apresentaram uma frequência maior de micronúcleos do que nos outros meses.

Tabela 8 – Média e desvio padrão do número de micronúcleos em 2.000 células de *Bryconamericus iheringi* e número de indivíduos analisados (*N*) nos pontos B e C do rio Cadeia em cada período de coleta. Valores de *p* para as comparações entre as coletas em um mesmo ponto são apresentados na última coluna e na última linha para as comparações entre os pontos em uma mesma coleta.

Pontos	Coletas				p (entre as coletas no mesmo ponto)
	Fevereiro/08	Junho/08	Agosto/08	Outubro/08	
B	1,33±1,50* (6)	0,1±0,31 (10)	0,1±0,31 (10)	0,4±0,69 (10)	p=0,01
C	0,57±0,53 (7)	0,2±0,42 (10)	0,1±0,31 (10)	0,1±0,31 (10)	p=0,07
p (entre os pontos da mesma coleta)	p=0,23	p=0,55	P=1,0	p=0,23	

*A coleta de fevereiro/08 difere significativamente das demais coletas do ponto B. (Teste ANOVA, Tuckey *a posteriori*).

Além de MN, foram observados outros tipos de anormalidades nucleares nos eritrócitos de *Bryconamericus iheringi* coletados no rio Cadeia. Foram encontrados eritrócitos binucleados, brotos nucleares e núcleos com alteração morfológica (“blebbed”, “lobed” e “notched”). Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 9. Eritrócitos binucleados foram observados somente na coleta de agosto de 2008, no ponto B, porém não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando comparado ao ponto C. Entretanto, observou-se que as médias de outras anormalidades nucleares diferiram significativamente entre os pontos B e C em uma mesma coleta. Houve diferença significativa ($p=0,03$) para broto nuclear apenas no mês de fevereiro de 2008 onde o ponto B apresentou maior média em relação ao ponto C. Quanto às anormalidades nucleares “blebbed+lobed+notched” verificou-se que tanto em junho como em outubro de 2008 o ponto C apresentou maior média diferindo significativamente ($p=0,01$) do ponto B. Em agosto de 2008, apesar do ponto B ter apresentado maior média do que o ponto C não houve diferença significativa ($p>0,05$).

Ao comparar as anormalidades nucleares entre as diferentes coletas em um mesmo ponto, a frequência de núcleos “blebbed+lobed+notched” apresentou diferenças significativas ($p=0,001$) onde o ponto B apresentou maior média em agosto diferindo de fevereiro e junho de 2008 e o ponto C apresentou maior média na coleta de outubro, diferindo significativamente ($p=0,0001$) de fevereiro e junho de 2008. Não se verificou presença de anormalidades nucleares “blebbed+lobed+notched” em fevereiro de 2008. Para brotos

nucleares, os pontos B e C não apresentaram diferenças significativas entre os meses de amostragens ($p>0,05$). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre períodos de coleta para ambos os pontos em relação a eritrócitos binucleados sendo que estes foram observados apenas no ponto B em agosto de 2008.

Tabela 9 - Média e desvio padrão das alterações nucleares nos eritrócitos de *Bryconamericus iheringi* coletados nos pontos B e C do rio Cadeia em quatro períodos de coletas.

Anormalidades nucleares	Fevereiro/08		Junho/08		Agosto/08		Outubro/08	
	Ponto B	Ponto C	Ponto B	Ponto C	Ponto B	Ponto C	Ponto B	Ponto C
Eritrócitos binucleados	0±0	0±0	0±0	0±0	0,2±0,4	0±0	0±0	0±0
Broto nuclear	0,5±0,6*	0±0*	0,1±0,3	0±0	0,1±0,3	0,1 ±0,3	0,1±0,3	0,2±0,6
Núcleos Blebbled + lobed + notched	0±0 ^a	0±0 ^a	0,1±0,3 ^{a,*}	0,8 ±0,8 ^{a,*}	3,7±4,6 ^b	1,7 ±1,8 ^{a,b}	1,1±1,0 ^{a,b*}	3,1 ±1,9 ^{b*}
<i>N</i>	6	7	10	10	10	10	10	10

Períodos de coleta com a mesma letra não diferem significativamente dentro do mesmo ponto.

*Diferença significativa ($p<0,05$) entre os pontos no mesmo período de coleta. (Teste ANOVA, Tuckey *a posteriori*).

5.3 Análise físico-química e microbiológica da água

Os valores para cada parâmetro analisado nas amostras de água dos pontos A, B e C do rio Cadeia e nos diferentes períodos de coleta são apresentados na Tabela 10. O parâmetro DBO₅ não foi detectado apenas em novembro de 2007 no ponto A. O parâmetro fósforo total foi detectado apenas em junho de 2008, nos pontos B e C, enquanto que o alumínio foi detectado apenas em junho e em setembro de 2008 nos pontos A, B e C. Concentrações de cromo foram verificadas nos pontos A, B e C, apenas em fevereiro de 2008. Todas as amostragens apresentaram presença de coliformes fecais.

Tabela 10 - Valores dos parâmetros analisados nas amostras de água coletadas nos três pontos de amostragem do rio Cadeia nos quatro períodos de coleta. PA = Ponto A; PB = Ponto B; PC = Ponto C.

Parâmetro	Unidade	Novembro/07*		Fevereiro/08			Junho/08			Setembro/08		
		PA	PC	PA	PB	PC	PA	PB	PC	PA	PB	PC
DBO ₅	mg O ₂ L ⁻¹	n.d.	5	3	3	5	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Nitrogênio amoniacal	mg L ⁻¹	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Fósforo total	mg L ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,012	0,069	n.d.	n.d.	n.d.
Alumínio	mg L ⁻¹	n.d.	0,06	n.d.	n.d.	n.d.	0,20	0,18	0,24	0,38	0,44	0,26
Chumbo	mg L ⁻¹	0,01	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cromo	mg L ⁻¹	n.d.	n.d.	0,007	0,012	0,018	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cobre	mg L ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,002	0,002	n.d.	0,002	n.d.
Níquel	mg L ⁻¹	0,02	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferro	mg L ⁻¹	0,40	0,58	0,42	0,51	0,54	0,22	0,24	0,20	0,25	0,30	0,19
Zinco	mg L ⁻¹	0,01	0,01	0,01	0,009	0,009	0,01	0,01	0,01	0,002	n.d.	n.d.
pH	---	7,26	6,98	7,54	7,39	6,95	7,06	6,90	7,18	7,18	7,41	7,38
Nitrato	mg L ⁻¹	0,30	0,34	0,26	0,34	0,58	n.d.	0,55	0,60	1,06	0,95	0,80
Nitrito	mg L ⁻¹	0,003	0,10	0,01	0,01	0,01	n.d.	n.d.	n.d.	0,003	n.d.	n.d.
Turbidez	NTU	1,40	1,80	2,15	1,77	2,83	0,02	0,45	0,60	2,00	1,40	0,02
Oxigênio dissolvido	mg L ⁻¹	7,73	7,56	8,13	7,72	8,13	8,33	9,14	9,25	7,31	7,93	7,93
Coliformes fecais (<i>E. coli</i>)	NMP/100mL	310	100	410	200	200	86	122	173	441	238	279

* Não há coleta no ponto B em novembro/07.

n.d = não detectado

As amostras de água coletadas em diferentes pontos do rio Cadeia foram enquadradas em classes de acordo com a resolução 357 do CONAMA/05 (Tabela 11).

Tabela 11 - Enquadramento das águas dos pontos analisados do rio Cadeia durante o período monitorado. PA = Ponto A; PB = Ponto B; PC = Ponto C. Classe 1: ■; Classe 2: ■; Classe 3: ■; Classe 4: ■

Parâmetro	Novembro/2007		Fevereiro/2008			Junho/2008			Setembro/2008		
	PA	PC	PA	PB	PC	PA	PB	PC	PA	PB	PC
DBO ₅	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Nitrogênio amoniacal	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Fósforo total	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Alumínio	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Chumbo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cromo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cobre	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Níquel	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Ferro	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Zinco	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
pH	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Nitrato	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Nitrito	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Turbidez	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Oxigênio dissolvido	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Coliformes fecais (<i>Escherichia coli</i>)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Os dados apresentados mostram que as águas do rio Cadeia no trecho e período analisado se encontram, segundo a maioria dos parâmetros, na classe 1. O parâmetro DBO₅ apresentou valores que enquadraram o ponto C tanto na coleta de novembro de 2007 como na coleta de fevereiro de 2008 na classe 2. Assim como coliformes fecais, que enquadraram o ponto A nas coletas de novembro de 2007, fevereiro de 2008 e setembro de 2008 e pontos B e C na coleta de setembro de 2008 na classe 2. Quanto aos metais, os níveis de alumínio na coleta de junho de 2008 nos pontos A e C e na de setembro de 2008 nos pontos A, B e C enquadraram as águas na classe 3, enquanto que os níveis de ferro na coleta de novembro de 2007 nos pontos A e C e na coleta de fevereiro de 2008 nos pontos A, B e C enquadraram as águas na classe 2. Somente a amostra do ponto C de junho de 2008 apresentou o parâmetro fósforo total dentro dos padrões de classe 4.

6. DISCUSSÃO

A proteção dos ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência antrópica sobre os sistemas biológicos (CAIRNS *et al.*, 1993). A definição de biomonitoramento mais aceita é o uso sistemático das respostas de organismos vivos, seja ele como um todo ou, através de um determinado tecido, para avaliar mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por ações humanas (SILVA *et al.*, 2003). Testes genéticos, utilizando peixes como bioindicadores, são bastante úteis para monitorar o meio aquático, constituindo uma ferramenta complementar às formas tradicionais de avaliação, que utilizam métodos físico-químicos e microbiológicos. Neste contexto o objetivo principal deste trabalho foi o de analisar o potencial genotóxico de três pontos do rio Cadeia no município de Santa Maria do Herval/RS utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em peixes além de analisar as propriedades físico-químicas e microbiológicas dos referidos pontos.

O rio Cadeia banha diversos municípios como Nova Petrópolis, Gramado, Dois Irmãos, Morro Reuter, Santa Maria do Herval, Ivoti e Portão. O município de Santa Maria do Herval recebe destaque em função de 97,55% dos seus 134,53 Km² de área, localizar-se dentro da sub-bacia do rio Cadeia, sendo que 100% da zona urbana estão inseridas nela. O rio Cadeia atravessa o município recebendo influência antrópica de diversas origens. A partir de um levantamento junto a Prefeitura Municipal de Santa Maria do Herval, as principais fontes em potencial de poluição do rio Cadeia são: a drenagem pluvial urbana e rural, atividades de criação de animais de pequeno e grande porte, resíduos sólidos urbanos, efluentes domésticos não tratados e industriais tratados, além dos agrotóxicos. Portanto, o presente estudo não teve o intuito de identificar um poluente específico ou uma fonte de poluição como genotóxicos e sim verificar se as misturas de poluentes de diversas origens encontradas em cada ponto de coleta apresentam diferenças quanto à ação genotóxica.

O trecho do rio Cadeia escolhido para o presente estudo compreende a zona rural, antes de qualquer influência urbana do município de Santa Maria do Herval (ponto A), um ponto intermediário, após a zona rural e início da zona urbana localizado no Balneário Amizade (ponto B) e um ponto após a área urbana localizado na represa da Usina Hidrelétrica Herval (ponto C). O ponto A sofre influência de fontes poluidoras tanto locais (agropecuária) como de municípios a jusante deste ponto, e, portanto, não pode ser considerado como local controle ou de referência.

No ensaio cometa aplicado em eritrócitos de *Astyanax jacuhiensis* a frequência das diferentes classes de dano apresentou diferenças significativas entre as amostragens. Em fevereiro de 2008 todos os pontos apresentaram maior frequência de células na classe 4. A classe 4 representa o grau máximo de quebras que a molécula de DNA pode sofrer, e, portanto os resultados sugerem que a ação genotóxica dos poluentes foi mais intensa no mês de fevereiro.

Ainda no ensaio cometa, não houve diferença significativa entre os pontos A, B e C para frequência de células com dano em todos os meses amostrados. Porém, a análise do índice de dano apresentou variação entre os pontos, onde B apresentou menor índice do que A e C no mês de fevereiro de 2008. Diferenças na genotoxicidade entre pontos de coleta em um rio podem estar relacionadas ao volume de água (variação na concentração dos agentes genotóxicos) e/ou ao efeito cumulativo de diferentes fontes (MATSUMOTO *et al.*, 2006). O ponto A, localizado na zona rural, recebe influência principalmente de agrotóxicos do município, mas não pode ser descartada a contribuição de outras fontes de contaminação a jusante, inclusive de origem industrial, pois na coleta de fevereiro de 2008 foi detectado cromo neste ponto. O fato de o ponto B apresentar menor índice de dano sugere que houve diluição dos agentes genotóxicos presentes no ponto A e também ausência de novas fontes geradoras de genotoxicidade, as quais parecem estar presentes novamente entre os pontos B e C. O ponto C, localizado após toda a zona rural e urbana do município, provavelmente recebe maior carga de poluentes e de origens mais diversificadas, e apesar de possuir grande volume de água, apresenta características de ambiente lântico, o que pode contribuir para o acúmulo de poluentes intensificando a ação genotóxica.

Também no ensaio cometa, foi observado diferenças significativas entre os períodos de coleta dentro de um mesmo ponto. Os pontos A e C apresentaram maior frequência de células com dano e índices de dano de DNA mais elevados em fevereiro de 2008. Tanto fatores abióticos como bióticos podem variar no tempo e no espaço influenciando a reposta dos biomarcadores (HANDY *et al.*, 2003). O grau de poluição de um rio pode sofrer influência de condições hidrológicas e climáticas. Variações sazonais desses fatores têm um grande efeito na concentração de poluentes no meio aquático (VEGA *et al.*, 1998, FERREIRA *et al.*, 1994). Quando as chuvas são escassas, o volume de água do rio tende a diminuir, fator que provavelmente contribui para uma maior concentração dos poluentes genotóxicos acarretando em maiores danos de DNA. Também devem ser considerados os plantios de culturas vegetais ao longo do ano. Milho, batata inglesa, laranja e mandioca, que

são as principais culturas da sub-bacia do rio Cadeia, são cultivados em diferentes épocas do ano utilizando diferentes tratamentos de agrotóxicos. Estima-se que na sub-bacia do rio Cadeia são utilizados cerca de 70.000 litros de agrotóxicos ao ano (KOTLHAR e DE LUCA, 1997). Portanto, o menor índice pluviométrico e as altas temperaturas do mês de fevereiro de 2008, com a conseqüente redução do nível do rio e elevação da concentração de poluentes, podem ter contribuído para a detecção de maior genotoxicidade neste período. A influência do índice pluviométrico também foi reportada na avaliação da qualidade do rio Caí, Rio Grande do Sul, numa área influenciada por um Complexo Petroquímico através do teste do micronúcleo em cultura de linfócitos humanos (LEMOS e ERDTMANN, 2000). Entretanto, não pode ser descartada também a ocorrência de variação temporal na quantidade e/ou nas fontes geradoras de compostos genotóxicos, podendo ser citado como exemplo a detecção de cromo nos três pontos de coleta somente neste período.

O cromo é um composto tóxico, genotóxico, mutagênico e carcinogênico tanto para o homem como para outros animais (VON BURG e LIU, 1993; STOHS e BAGCHI, 1995; MOUNT e HOCKET, 2000). Diversos estudos retratam a correlação entre o aumento das taxas de dano de DNA e presença de cromo na água. RUSSO *et al.* (2004) analisaram o potencial genotóxico do rio Sarno, na Itália, em relação a um rio considerado controle. O rio Sarno é impactado por diversas fontes de poluição como efluentes domésticos, industriais e de agricultura. Ao analisar as propriedades físico-químicas da água observaram altas concentrações de cromo e manganês e baixas concentrações de cádmio e chumbo. Verificaram que houve maior índice de dano de DNA no ensaio cometa e maior frequência de micronúcleos nos peixes do rio Sarno do que do grupo controle.

O presente estudo confirma a utilização do ensaio cometa em eritrócitos de peixes como uma ferramenta bastante sensível para a detecção de genotoxicidade nos ecossistemas aquáticos, corroborando com resultados obtidos em outros trabalhos como PANDRANGI *et al.* (1995) e RUSSO *et al.* (2004).

A análise de micronúcleo em eritrócitos de *Bryconamericus iheringi* não apresentou diferença significativa entre os pontos B e C em todos os meses amostrados. Porém, apenas o ponto B apresentou variação ao longo do período de estudo, com um maior número de micronúcleos em fevereiro de 2008 do que nos demais meses. Os resultados do teste do micronúcleo corroboram aqueles obtidos com o ensaio cometa para o mês de fevereiro e indicam ação crônica de agentes genotóxicos, os quais podem estar comprometendo a qualidade da água no trecho estudado do rio Cadeia de modo mais significativo em períodos

específicos do ano. Isto sugere que, exposições crônicas a essas águas podem afetar a biota presente neste ecossistema, bem como a saúde da população, já que o ponto B é um balneário. A não detecção de maior genotoxicidade no ponto B no mês de fevereiro através do ensaio cometa pode indicar que a ação dos compostos presentes neste local depende de um maior tempo de exposição (descartando-se possíveis diferenças de resposta entre as espécies utilizadas em cada análise).

Além dos micronúcleos, outras anormalidades nucleares foram analisadas. Foi verificada a presença de brotos nucleares em quase todas as coletas analisadas, porém em fevereiro de 2008 houve diferença entre os pontos onde apenas o ponto B apresentou broto nuclear diferindo significativamente do ponto C. SERRANO-GARCIA e MONTERO-MONTAYA (2001) demonstraram que os brotos nucleares e os micronúcleos possuem a mesma origem, seguindo a exposição de compostos mutagênicos (clastogênicos e aneugênicos).

Em junho e outubro de 2008 o ponto C apresentou maior frequência de núcleos “blebbed+lobed+notched” do que o ponto B. Ao analisar as anormalidades nucleares dentro de um mesmo ponto entre períodos de coleta, o ponto B apresentou maior frequência de núcleos “blebbed+lobed+notched” em agosto diferindo de fevereiro e de junho de 2008, enquanto que o ponto C apresentou maior frequência de núcleos “blebbed+lobed+notched” em outubro diferindo de fevereiro e junho de 2008. Um número considerável de trabalhos publicados tem reportado associação entre a frequência de anormalidades nucleares e exposição a compostos genotóxicos (PACHECO e SANTOS, 1997; 2002; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; FERRARO *et al.*, 2004). Outros estudos encontraram frequências elevadas de tais anormalidades em peixes que habitam locais poluídos (BOMBAIL *et al.*, 2001), na avaliação de efluentes industriais (ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003) ou que são expostos a diferentes químicos. MATSUMOTO *et al.* (2006) verificaram um aumento nas anormalidades nucleares de *Oreochromis niloticus* em um lugar influenciado por efluentes de curtumes e, portanto contaminado por cromo, em relação a um local controle. Entretanto, em alguns estudos não há uma correlação entre aumento de micronúcleos, que consiste em um marcador de genotoxicidade reconhecido, e aumento de anormalidades nucleares (AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000) o que sugere a existência de diferenças (em relação à natureza química da substância, dose, tempo de exposição) no surgimento destes marcadores, pelo menos para alguns compostos. No presente estudo o teste de anormalidades nucleares também indicou diferenças temporais na genotoxicidade do rio

Cadeia. Entretanto, diferentemente dos resultados discutidos anteriormente, estes marcadores não evidenciaram maior genotoxicidade nas coletas de fevereiro de 2008. Na ausência de informações mais aprofundadas na literatura sobre a origem destas anormalidades, pode-se apenas especular que no presente estudo, os compostos que provocam tais alterações são diferentes e/ou apresentam variação temporal diferente das substâncias que aumentam as frequências dos outros marcadores de genotoxicidade.

A análise físico-química e microbiológica demonstrou que as amostras de água dos três pontos estudados do rio Cadeia são de boa qualidade, com a maioria dos parâmetros enquadrando-se na classe 1. As águas de classe 1 podem ser utilizadas no abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho (CONAMA, resolução nº357/05), à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas (CONAMA nº 274/2000). Porém, alguns parâmetros apresentaram qualidade reduzida em algumas amostras, demonstrando variação tanto temporal como espacial. O parâmetro DBO₅ não foi detectado em apenas uma amostra, sendo que em 18,2% das amostragens foi classificado como classe 2. Os parâmetros coliformes fecais e ferro foram detectados em todas as amostragens, e 45,5% destas foram de classe 2. As águas de classe 2 podem ser utilizadas no abastecimento para consumo humano após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto e à aqüicultura e à atividade de pesca (CONAMA, resolução nº357/05). Aumentos de DBO₅ num corpo d'água estão relacionados com despejos de origem predominantemente orgânica. A presença de um alto teor de matéria orgânica pode induzir à completa extinção do oxigênio na água, provocando o desaparecimento de peixes e outras formas de vida aquática. Já o aumento dos níveis de coliformes fecais pode indicar a presença de microrganismos patogênicos pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifóide, febre paratifóide, desintéria bacilar e cólera (CETESB, 2006). O aumento da DBO₅ e de coliformes fecais são indicativos de poluição por esgoto doméstico no trecho estudado. Conforme levantamento junto a Prefeitura Municipal de Santa Maria do Herval, não existe tratamento de efluentes domésticos, sendo que a maioria das casas possui fossa séptica com filtro anaeróbico.

O alumínio, detectado em 63,6% das coletas, apresentou em 45,5% dos casos concentrações que ultrapassaram os limites estabelecidos para classe 2. As águas classificadas na classe 3 podem ser utilizadas no abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário e à dessedentação de animais. Recreação de contato secundário refere-se àquela associada a atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir água é pequena, como na pesca e na navegação (tais como iatismo) (CONAMA, resolução nº357/05). Existem evidências de que o alumínio é neurotóxico (CETESB, 2006), e considerando que o ponto B refere-se a um balneário onde as pessoas estão expostas ao contato primário, evidencia-se o risco a saúde da população local exposta.

O parâmetro fósforo foi detectado somente no mês de junho de 2008 nos pontos B e C, sendo que neste último apresentou valores elevados, enquadrando-se na classe 4, o que restringi seu uso somente para navegação e harmonia paisagística (CONAMA, resolução nº357/05). A presença elevada de fósforo na água superficial está relacionada à contaminação por esgoto sanitário. O fósforo é encontrado na composição de detergentes superfosfatados e na própria matéria fecal. As águas drenadas em áreas agrícolas e urbanas também podem provocar a presença excessiva de fósforo em águas naturais. O excesso de fósforo conduz a processos de eutrofização das águas naturais (CETESB, 2006). Ao longo do trecho analisado existem criadouros de animais de pequeno porte, plantações além de um frigorífico muito próximo ao ponto C que podem estar colaborando para o aumento da concentração de fósforo em determinadas épocas do ano.

Uma desvantagem da análise físico-química é que ela registra apenas o momento em que as amostras de águas foram coletadas, como uma fotografia do rio, necessitando assim de um grande número de análises para a realização de um monitoramento temporal eficiente. Outro problema é que se forem feitas longe da fonte poluente, as medições químicas não serão capazes de detectar perturbações sutis sobre o ecossistema (PRATT e COLER, 1976) enquanto que os peixes metabolizam poluentes diretamente através da água contaminada ou indiretamente pela ingestão de outros organismos aquáticos contaminados (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Portanto, mesmo estando dentro das normas, alguns parâmetros pode estar degradando as inter-relações biológicas, gerando problemas de qualidade de vida para as populações daquele ecossistema (BUSS *et al.*, 2003), o que ficou demonstrado nas análises de genotoxicidade do presente estudo.

De maneira geral, os resultados significativos de danos de DNA observados neste estudo, tanto pelo ensaio cometa em *Astyanax jacuhiensis*, quanto pelo teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em *Bryconamericus iheringi*, demonstram variação tanto temporal como espacial da genotoxicidade e de alguns parâmetros de qualidade da água do rio Cadeia no município de Santa Maria do Herval/RS, os quais podem estar sendo influenciados também por municípios a jusante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L comp. **Biochem. Physiol.** 85C, p. 5-9, 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in Water. **Mutat. Res.** 343, p. 121-135, 1995.

ANDRADE, V.M. FREITAS T.R.O; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatics environmente. **Mutat. Res.** 560, p. 57-67, 2004.

ARNAIZ, R. R. Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos. 2 ed. México,1995. 267 p. AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat. Res.** 467, p. 177-186. 2000.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the *in vivo* alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat. Res.** 415, p. 167-184, 1998.

BIANCHI, V.; CELOTTI, L.; LANFRANCHI, G.; MAJONE, F. MARIN, G.; MONTALDI, A.; SPONZA, G.; TAMINO, G.; VENIER, P.; ZANTEDESCHI, A.; LEVIS, A. G. Genetic effects of chromium compounds. **Mutat. Res.** 117, p. 279-300, 1983.

BICHKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATWHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutat. Res.** 463, p. 33-51, 2000.

BOMBAIL, V.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnelus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosp.** 44, p. 283-392, 2001.

BÜCKER, 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.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pub.** 19(2) p. 465-473, mar-abr, 2003.

CAIRNS, J.; McCORMICK, P. V.; NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrob.** 263, p. 1-44, 1993.

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

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S.; Assessment os the piscine micronuclei test *in situ* biological indicator of chemical contaminats effects. **Canad. Journ. of Fish. and Aquatic Scienc.** 47,p. 2123-2136, 1990.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-staind nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutat. Res.** 534, p.93-99. 2003.

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

CONAMA, resolução 357 de 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/por/conama/res/res/05/res35705.pdf>

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformations constraints in nuclear DNA. **Journ. of Cell Science.** 22, p. 287-302, 1976.

ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. **Aquatic. Toxicol.** 90, p. 154–159. 2008.

DAS, R.K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutat. Res.** 175, p. 67 - 71, 1986.

DE FLORA, S.; VIGANÒ, L.; AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutat. Res.** 319, p. 167-177, 1993.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.** 521, p. 121-135, 2002.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Health effects assessment for naphthalene. Report of the U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development. EPA/ 600/8-89/094, Cincinnati, OH, 1988.

ESTEVEES, F.A. *Fundamentos de Limnologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FENECH, M. CROTT, J. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient in human lymphocytes – evidence for breakage – fusion – bridge cycles in the cytokinesis – block micronucleus assay. **Mutat. Res.** 504 p. 131-136. 2002.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.** 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.** 534, 65–75, 2003.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagen.** 14, n. 6, p. 605-612, 1999.

FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental / PRÓ-GUAIBA, 1997. Diagnóstico da poluição gerada pelas indústrias localizadas na área da bacia hidrográfica do Guaíba. Porto Alegre.

FEPAM Fundação Estadual de Proteção Ambiental, 1997. Efluentes Líquidos industriais: cargas poluidoras lançadas nos corpos hídricas do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genet. and Molec. Biolog.** 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FERREIRA, C. J. A.; SORIANO, B. M. A.; GALDINO, S.; HAMILTON, S. K. Anthropogenic factors affecting waters of the Pantanal wetland and associated rivers in the upper Paraguay river basin of Brazil. **Rev. Limnol. Brasil.** 5, p. 135- 148, 1994.

FRENZILLI, G.; SCARELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. **Mutat. Res.** 552, p. 187-195, 2004.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutat. Res.**, 491, p. 39-44, 2001.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA M.E.; SANTOS, M.A.; PACHECO M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicol. and Environm. Saf.** 70, p.411–421. 2008.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA,N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutat. Res.** 399, p. 125-133, 1998.

HANDY, R. D., GALLOWAY, T. S., DEPLEDGE, M.H. A proposal for the use f biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. **Ecotoxicol.** 12, p. 331-343, 2003.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J. T.; SALAMONE, M. F. The Indution of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutat. Res.** 123, p. 61-118, 1983.

HOFFMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) en the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pigmaea* by ethil methanesulphonate. **Mutat. Res.** 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.

<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/rios/variaveis.asp#> (acessado em 15 de Janeiro de 2009).

JHA, A. N.; HUTCHINSON, T. H.; MACKAY, J. M.; ELLIOTT, B. M.; DIXONS, D. R. Evaluation of the genotoxicity of municipal sewage effluent using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae), **Mutat. Res.** 391, p. 179-188, 1997.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; KANGWANRANGSAN, N.; ZAKARIA, S. The protective influence of ascorbic acid against the genotoxicity of waterborne lead exposure in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Journ. of Fish Biol.** 73, p. 355-366, 2008.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutat. Res.** 498, p. 61-77, 2001.

KIRSCH-VOLDERS M.; VANHAUWAERT A.; BOECK M. D.; DECORDIER I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat. Res.** 504, p. 137-148, 2002.

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

KOTLHAR, M. K., DE LUCA, S. J. Simulação da qualidade de água do rio Cadeia com aplicação de modelo matemático para determinação do aporte de poluentes em cursos d'água provenientes de drenagem de áreas rurais. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1997.

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.

LEMO, C.T.; ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutat. Res.** 467 p. 1-9, 2000.

MACHADO, T.; GADELHA, L.M.; JUNIOR, W. R. S.; DINIZ, F. E. G.; COLARES, D. A.; NEVES, A. F. J. F. Avaliação preliminar da presença de chumbo e cromo em mananciais do estado da Paraíba, utilizados em sistemas urbano de abastecimento de água. Anais do 23º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES, 2005.

MANNA, G. K.; BANERJEE, G.; GUPTA, S. Micronucleus Test in The Peripheral Erythrocytes of The Exotic Fish, *Oreochromis mossambica*. **The Nucleus.** 28 n. 3, 176-179, 1985.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: **A bacia do rio Tibagi**, cap. 29, p. 551-557, 2002.

MATSUMOTO, S. T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

MATSUMOTO, S. T; MANTOVANI, M. S; MALAGUTTI, M. I. A; DIAS, A. L; 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 on root-tips. **Genet. and Molec. Biol.** 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

McNAMEE, J. P.; McLEAN, J. R. N.; FERRAROTTO, C. L.; BELLIER, P. V. Comet assay:rapid processing of multiple samples. **Mutat. Res.** 466, n. 1, p. 63-69, 2000.

METCALF, C. D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 40, p. 489-495, 1988.

MÍDIO, A. MARTINS, D. I. Toxicologia de alimentos. São Paulo:Varela, 2000, 295p.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei Pisces) from to Natural Environments: A Bioassay for the *in situ* Detection of Mutagens in Freshwater. **Mutat. Res.** 367, p. 245-251, 1996.

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

MORAES, D. S. L. **Avaliação dos potenciais tóxico, citotóxico e genotóxico de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. 2000. 158 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

MOUNT, D. R.; HOCKETT, J. R. Use of toxicity identification evaluation methods to characterize, identify, and confirm hexavalent chromium toxicity in an industrial effluent. **Water Res.** 34, p. 1379-1385, 2000.

NAIME, R. H.; FAGUNDES, R. S. **Controle da Qualidade da água do Arroio Portão, RS**. Instituto de Geociências, UFRGS, Pesquisa em Geociências, 32. Porto Alegre – Brasil, 2005.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem. And Biophys. Res. Communic.** 123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Naphthalene and h-naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environ. Internat.** 28, p. 285– 293. 2002.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxic. and Environ. Saf.** v. 38, p. 252-259, 1997.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline Single Cell Gel (comet) Assay and Genotoxicity Monitoring using Bullheads and Carp. **Environ. Molec. Mutag.** 26, p. 345-356, 1995.

PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. 2005. **Environ. Res.** 97. p. 287-292, 2005.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science.** 246, p. 352-358, 1989.

PRATT, J. M.; COLER, R. A. A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. **Water Res.** 10. p. 1019-1025, 1976.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173-200.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-28.

RODRIGUES, M. L. K.; FORMOSO, M. L. L. Exposure to selected heavy metals through water ingestion in an area under the influence of tanneries. **Environ. Geochem. and Health.** 27, 397. p. 408. 2005

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 5 th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. **Mutat. Res.** 337, p. 57-60, 1995.

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

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. . In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 201-220.

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: **Principles and Methods for Their Detection** (Hollanender, A., ed.). Plenum Press, New York, v. 4, p. 31-53, 1975.

SERRANO-GARCIA, L.; MONTERO-MONTAYA, R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environ. Molec. Mutag.** 38, p. 38-45, 2001.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance.2003. Cap. 8, p. 167-170.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experim. Cell Res.** 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SPERLING, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. **Bio.**, 2 n. 3, p. 53-6, 1993.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms is the toxicity of metal ions. **Free Radic. Biol. Méd.** 18, p. 321-336. 1995.

TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; VAZ ROCHA, J.A.; VARGAS, V.M.F. Mutagenicidade do sedimento e estresse oxidativo hepático em peixes sob a influência de curtumes. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 1, n.1, p. 57-61, 2006.

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

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILLIPS, D. H.; VENNIT, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK; p. 315-339, 1995.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O biol.** 64, n. 2, jul./dez., 2002.

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

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMELEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in risk assessment: a review. **Environ. Toxic. and Pharmac.**13, p. 57-149, 2003.

VAN DER WERF, M. G. Assessing the impact of pesticides on the environment. **Agricul. Ecosy. Environ.**, 60, p. 81-96, 1996.

VARGAS, V. M. F; ROSA, D. P; SARMENTO, E. C; ROSA, J. A; V.TAGLIARI, K. C; HORN, R. C; CARDOZO, T. R; PEREIRA, T. S; PASTORIZA, T.F; SANTOS, C.A. Atividade mutagênica como parâmetro ambiental para avaliar a qualidade das bacias hidrográficas. **Fepam em Revista.** 1, n.1, jan./jun. 2007.

VEGA, M.; PARDO, R.; BARRADO, E.; DEBÁN, L. Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. **Water Res.** 32, n. 12, p. 3581-3592, 1998.

VON BURG, R.; LIU, D. Chromium and hexavalent chromium. **Journ. Appl. Toxicol.** 13, p. 225-230, 1993.

VON SPERLING, E. Análise dos padrões brasileiros de qualidade de corpos de água e de lançamentos de efluentes líquidos. **Rev. Bras. de Rec. Híd.** 3, n.1. p. 111-132. 1998.

WALKER, J. A.; BOREHAM, D. R.; UNRAU, P.; DUCAN, A. M. V. Chromosome content and ultrastructure of radiation – induced micronuclei. **Mutat. Res.** 11, n. 5, p. 419-424, 1996.

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

WRIGHT, R. T.; NOBEL, B.T. In: **Environmental Science: The Way World Works.** 7. ed., cap. 18, 2000.