

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

SABRINA DE SOUZA CARDOSO

**BIOMONITORAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO DOURADOS
POR MEIO DE AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM
Astyanax lacustris (CHARACIDAE)**

DOURADOS, MS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Sabrina de Souza Cardoso

**BIOMONITORAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO DOURADOS
POR MEIO DE AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM
Astyanax lacustris (CHARACIDAE)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, no Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados. Orientador (a): Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia.

DOURADOS, MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C266a Cardoso, Sabrina de Souza.
Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de água do rio Dourados em *Astyanaxlacustris*(CHARACIDAE). / Sabrina de Souza Cardoso. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 38f.

Orientadora: Profa. Dra. AlexeiaBarufattiGrisolia.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Monitoramento ambiental. 2. Micronúcleo. 3. Alterações morfológicas nucleares. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

SABRINA DE SOUZA CARDOSO

**BIOMONITORAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO DOURADOS
POR MEIO DE AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM
Astyanax lacustris (CHARACIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito necessário para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, pela banca examinadora formada por:

Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia

Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Fábio Kummrow

Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Bruno do Amaral Crispim

Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, MS
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me guiar, proteger e abençoar em todos os momentos.

A toda minha família, em especial, aos meus pais e irmã por todo amor, apoio incondicional, incentivo e por não medirem esforços para concretização deste sonho. Devo a vocês tudo o que tenho e sou, agradeço pela benção que é ter vocês ao meu lado.

À Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia, pela orientação, confiança e a oportunidade de aprender cada dia mais com seus ensinamentos.

Aos membros antigos e atuais do Laboratório de Biotecnologia aplicada a Produção Animal e do Laboratório de Mutagênese Ambiental: Ândrea, André, Luiza, Danielly, Jéssica, Deborah e demais pelo convívio, ensinamentos e ajuda.

Aos grandes responsáveis pelo meu aprendizado científico, Juliana Caroline Vivian Spósito e Bruno do Amaral Crispim, pela disposição em me ajudar nos momentos de dificuldade, ensinamentos, paciência, generosidade e amizade. Obrigada por contribuírem no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus queridos amigos Pedro Rocha, Evelize Nogueira e Gabriela Dan por estarem ao meu lado nos momentos bons e nos ruins, pela amizade, compreensão, cuidado, motivação e por serem meu porto seguro durante esses quatro anos de graduação.

Aos meus amigos Vagner Berres, Victor Rino, Júlia Zeli, Pamella Castilho, Andreza Garbin, Mary Martins, Kamila Savala, Vander Berres e Wellinton Jhon pelo apoio, companheirismo e por tornarem meus dias mais leves e felizes.

A V Turma de Biotecnologia e todos os amigos que ganhei ao longo desses quatro anos na cidade de Dourados, pela amizade e convívio. Juntos superamos muitos desafios, vocês foram parte fundamental nessa conquista.

Ao meu namorado Cassiano Roos por todo o carinho, incentivo, companheirismo e por acreditar em mim nos momentos em que mais precisei.

A UFGD, CAPES, CNPq e FUNDECT pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento. Pois é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino”
(Provérbios 3: 13,14)

**BIOMONITORAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO DOURADOS
POR MEIO DE AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA EM
Astyanax lacustris (CHARACIDAE)**

RESUMO

Ações antrópicas como urbanização, industrialização e atividades agrícolas resultam na contaminação dos recursos hídricos. Considerando os riscos que esses contaminantes podem causar à saúde dos organismos vivos, o monitoramento de danos genéticos tem despertado o interesse do meio científico, a fim de contribuir para planos de controle da qualidade de água. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial mutagênico e genotóxico de amostras de água provenientes do Rio Dourados em eritrócitos de *Astyanax lacustris*, peixes popularmente chamados de lambaris. Amostras de água foram coletadas nos períodos de estiagem e alta pluviosidade. Para as análises biológicas foram realizados testes de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares em *A. lacustris*. As médias de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro Wilk e posteriormente, ao teste de Kruskal-Wallis a 5%. Os resultados indicaram que as amostras de água não apresentaram efeito mutagênico em eritrócitos dos peixes nos diferentes pontos de coleta. Em relação aos pontos de coleta ao longo do rio, o ponto 9 foi o local com maior número de alterações morfológicas nucleares, em ambos os períodos avaliados. Considerando os períodos de coleta, o mês de novembro apresentou maior número de danos genéticos, o que pode ser atribuído ao período de alta pluviosidade, lixiviando contaminantes do solo para o rio e fazendo com que poluentes aprisionados no sedimento subam para a superfície. Desta forma, bioensaios em *A. lacustris*, demonstraram ser uma ferramenta útil e sensível na avaliação de recursos hídricos impactados em diferentes pontos e períodos de coleta.

Palavras-chave: Monitoramento ambiental, Micronúcleo, Alterações morfológicas nucleares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Astyanax lacustris</i>	16
Figura 2. Formação do micronúcleo por efeitos clastogênico e aneugênico.....	18
Figura 3. Alterações morfológicas nucleares em <i>Astyanax sp.</i>	19
Figura 4. Mapa do Rio Dourados, MS, ilustrando os pontos amostrais.	20
Figura 5. Fotos referentes aos pontos de coleta ao longo do Rio Dourados	21
Figura 6. Aquário contendo amostra de água com peixes durante período de exposição	22
Figura 7. Alterações morfológicas nucleares observadas no estudo.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média de chuvas nos períodos antecedentes às coletas	25
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos obtidos a partir de amostras de águas coletadas.....	26
Tabela 3. Alterações genéticas observadas em <i>Astyanax lacustris</i> após período de exposição à amostras de água provenientes do Rio Dourados – Mato Grosso do Sul/Brasil nos períodos de Junho e Novembro de 2015.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. HIPÓTESES	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1 Rio Dourados	14
4.2 Águas Classe III	14
4.3 Biomonitoramento	15
4.4 <i>Astyanax lacustris</i>	16
4.5 Teste de Micronúcleo	17
4.6 Alterações morfológicas nucleares	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

INTRODUÇÃO

Recursos hídricos estão expostos à contaminação decorrente de atividades agroindustriais, como descarga de efluentes, uso de produtos químicos e despejo de esgotos domésticos, contribuindo assim para sua degradação (PHILIPPI e PELICIONI, 2005).

No Estado do Mato Grosso do Sul, à intensa produtividade agrícola, principalmente pelas culturas temporárias de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho e soja, e consequente utilização de defensivos agrícolas em grandes quantidades não segue adequadamente os controles de qualidade do meio ambiente (IBGE, 2013).

O Rio Dourados têm sido alvo de atividades econômicas concentradas que liberam efluentes de esgoto doméstico, lixo urbano e descarte de resíduos agrícolas e industriais, comprometendo a qualidade destes recursos (CAMPOS *et al.*, 2003). De acordo com Hoshina (2005), o despejo de resíduos pode ocasionar danos no material genético de organismos vivos, alterando e danificando processos vitais dos mesmos.

Parâmetros estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Resolução nº 357, 2005) definem limites aceitáveis de compostos nas águas dos rios, possibilitando assim a avaliação das condições físico-químicas e biológicas, a fim de garantir a qualidade dos corpos hídricos e o bem-estar dos ecossistemas (CARITÁ, 2010). Contudo, parâmetros físico-químicos não fornecem informações sobre a estabilidade genética dos organismos vivos expostos a contaminantes ambientais.

Diante do exposto, estudos que avaliem a genotoxicidade e mutagenicidade destes compostos no ambiente se tornaram indispensáveis para assegurar a qualidade das águas e da biota local (VENTURA *et al.*, 2008).

Dentre os testes utilizados no monitoramento ambiental, a análise de micronúcleos (MCNs) e alterações morfológicas nucleares é considerada eficaz e sensível na avaliação de danos genéticos associados a contaminantes aquáticos (DE CASTILHOS GHISI, 2014).

O teste de Micronúcleo desenvolvido por Boller e Schmid (1970) permite analisar danos causados por agentes químicos, físicos e/ou biológicos. Os MCNs são estruturas

formadas a partir de fragmentos cromossômicos e/ou cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular (HOLLAND *et al.* 2008).

A análise de alterações morfológicas nucleares permite observar a ação de agentes genotóxicos sobre as células durante as fases de mitose e meiose, visto que essas substâncias são responsáveis por originar alterações cromossômicas estruturais e numéricas. Com isso, o estudo de alterações morfológicas nucleares, como: célula binucleada, núcleo lobulado, ponte neoplasmática, entre outras, tornou-se ferramenta fundamental para avaliação da integridade genômica das células (RAMIREZ, 2000).

A utilização de peixes para avaliação de danos genéticos em recursos hídricos impactados é considerada eficiente, pois são organismos sensíveis e que respondem aos tóxicos de modo similar ao dos grandes vertebrados. Desta forma, a utilização da espécie *Astyanax lacustris* nos testes de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares torna-se alternativa competente, segura e de grande importância para a avaliação da qualidade da água (RAMSDORF *et al.*, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho visou contribuir com informações referentes à potencialidade genotóxica e mutagênica de amostras de águas superficiais do Rio Dourados, a partir da avaliação de danos genéticos em *A. lacustris*.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água do Rio Dourados em *Astyanax lacustris*.

Objetivos específicos:

- Avaliar as condições físico-químicas de amostras de água do Rio Dourados;
- Avaliar mutagenicidade e genotoxicidade em amostras de água do Rio Dourados nos períodos de estiagem e alta pluviosidade;
- Avaliar mutagenicidade e genotoxicidade em diferentes pontos amostrais ao longo do Rio Dourados.

HIPÓTESES

H0: Diferentes pontos amostrais ao longo do Rio Dourados, nos períodos de estiagem e alta pluviosidade, não apresentam genotoxicidade e mutagenicidade avaliadas em *Astyanax lacustris*.

H1: Diferentes pontos amostrais ao longo do Rio Dourados, nos períodos de estiagem e alta pluviosidade, apresentam genotoxicidade e mutagenicidade avaliadas em *Astyanax lacustris*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Rio Dourados

O Rio Dourados nasce na cidade de Antônio João, no Estado do Mato Grosso do Sul, próximo as imediações da serra de Maracajú, a uma altitude de aproximadamente 700 metros, percorre todo o planalto, até a cidade de Fátima do Sul e então toma direção norte até a sua foz, percorrendo uma extensão de 374 quilômetros, até desembocar no Rio Brilhante (DE PAULA, 2011).

As águas superficiais do Rio Dourados, classificadas como classe III (CONAMA, 2005), abastecem cerca de 75% da população urbana do município de Dourados-MS, o que torna seus recursos de suma importância para os habitantes locais. Estes recursos são destinados principalmente para abastecimento público, irrigação e dessedentação de animais e indústrias (DE PAULA, 2011).

Onze dos 77 municípios que constituem o estado de Mato Grosso do Sul, pertencem total ou parcialmente à Bacia do Rio Dourados. O principal pólo regional da bacia é a cidade de Dourados, com mais de 215 mil habitantes (IBGE, 2016), representando 47,8% do total da população pertencente à bacia, e destaca-se como importante centro de desenvolvimento econômico, em decorrência da expansão de sua fronteira agrícola (Mato Grosso do Sul, 2000).

Neste contexto, o monitoramento da qualidade dos recursos hídricos do Rio Dourados, torna-se indispensável, tendo em vista à preservação da biodiversidade aquática e do meio ambiente, além de contribuir com informações sobre a qualidade da água e colaborar com a saúde pública.

Águas de classe III

Os corpos hídricos nacionais são classificados em nove classes, sendo cinco classes de água doce (baixa quantidade de sais minerais), duas de águas salobras (média quantidade de sais minerais), e as duas de águas salinas (alta quantidade de sais minerais) (TERA, 2015).

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) águas de classe III podem ser destinadas: (1) ao abastecimento para consumo humano, após

tratamento convencional ou avançado; (2) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; (3) à pesca amadora; (4) à recreação de contato secundário; e (5) à dessedentação de animais.

A classificação de recursos hídricos visa garantir que a qualidade da água seja compatível com a sua demanda, de acordo com a Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH – Lei N. 9.433/97), e possibilita maior controle da poluição e avaliação das condições em que encontram-se os corpos d'água, visando garantir a qualidade destes recursos.

Biomonitoramento

A liberação de produtos químicos, que possuem em sua composição agentes genotóxicos e/ou carcinogênicos, no meio ambiente tem aumentado devido à atividade humana, tanto rural e industrial, quanto urbana. A detecção destes produtos e seus efeitos em organismos vivos é de extrema importância para avaliação do impacto que podem causar às populações animal, vegetal e humana. O emprego de bioindicadores tem se mostrado uma ferramenta eficaz para tal avaliação, baseado na utilização de organismos fenotipicamente sensíveis a lesões no DNA causadas por esses agentes (DA COSTA e MENK, 2000).

Bioindicadores tem sido comumente utilizados nos últimos anos, pois apresentam alta capacidade de identificação de danos causados por poluentes atmosféricos, aquáticos ou do solo, mesmo em quantidades abaixo da exigida por órgãos reguladores. Contudo, bioensaios são considerados eficazes na identificação de efeitos adversos de substâncias sobre organismos, em diferentes concentrações e em diferentes tempos de exposição (CARITÁ, 2010).

A utilização de peixes em estudos de monitoramento ambiental apresenta múltiplas vantagens como; alta sensibilidade à exposição a agentes tóxicos, responde de forma semelhante a outros vertebrados, podem acumular substâncias tóxicas, respondem a baixas concentrações de substância mutagênicas e podem ser utilizados em testes *in vivo* (VANDER OOST, 2003; ÇAVAS e ERGENE-GOZUKARA, 2005).

Dentre as espécies de peixes destinadas à bioensaios, a espécie *Astyanax lacustris* é considerada sensível à contaminação ambiental, podendo indicar o potencial

genotóxico e mutagênico de contaminantes presentes na água para consumo sobre populações humanas (RAMSDORF, 2007).

***Astyanax lacustris* (Characidae)**

Astyanax lacustris é uma espécie pertencente à ordem Characiformes, considerada dominante entre peixes de água doce da América do Sul, sendo da família Characidae, a maior e a mais complexa desta ordem. A subfamília da espécie é a Tetragonopterinae, representa o maior número de espécies no Brasil, comumente conhecida por englobar peixes popularmente chamados de lambaris (BRITSKI et al., 2007).

O gênero *Astyanax* foi proposto por Bair e Girard (1854), apresenta distribuição geográfica ampla na região Neotropical e é abundante nas bacias hidrográficas brasileiras, pois engloba aproximadamente 100 espécies e subespécies nominais. Inclui peixes de pequeno porte, até 200 mm, que caracterizam-se pelo corpo prateado, região ventral esbranquiçada e a dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas (GARUTTI e BRITSKI, 2000) (Figura 1).



Figura 1: Exemplar de *Astyanax lacustris*. Fonte: Sussel, 2007.

A espécie possui versatilidade ecológica, capacidade de ajuste a diversas situações ambientais, competência adaptativa exploratória, e utiliza estratégias diferenciadas na estrutura populacional (ORSI et al., 2004). Foi proposta como organismo bioindicador, pois apresenta ampla distribuição geográfica, valor econômico

agregado e por ser considerado organismo sentinela em estudos de genotoxicidade ambiental (GALVAN, 2011).

Dentre esses estudos, a utilização da espécie no teste de micronúcleo para monitoramento ambiental se destaca, pois, possibilita a avaliação da potencialidade mutagênica de agentes presentes no ambiente, sendo considerada um bioindicador que permite avaliar a mutagenicidade do ecossistema (DA SILVA SOUZA e FONTANETTI, 2006).

Teste de Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi desenvolvido por Boller e Schmid (1970) em eritrócitos de medula óssea e sangue de hamster e adaptado para eritrócitos de peixes por Hooftman e Raat (1982). Atualmente é muito utilizado para detecção de agentes clastogênicos, responsáveis pela indução de quebras cromossômicas, e agentes aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (NATARAJAN, 2002), principalmente em ensaios citogenéticos *in vivo* na área de genética toxicológica (FENECH, 2000).

A formação de micronúcleos ocorre em células filhas como consequência à ação de contaminantes sobre células parentais, são provenientes de fragmentos cromossômicos resultantes de quebras que não foram incorporadas ao núcleo principal das células filhas, após a mitose (Figura 2). Estes fragmentos são visíveis como pequenos núcleos separados do núcleo principal, pois são revestidos por uma membrana nuclear. Os pequenos núcleos podem ser formados também a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorrem danos ao aparelho mitótico celular, ou nos cromossomos propriamente ditos (RIBEIRO, 2003).

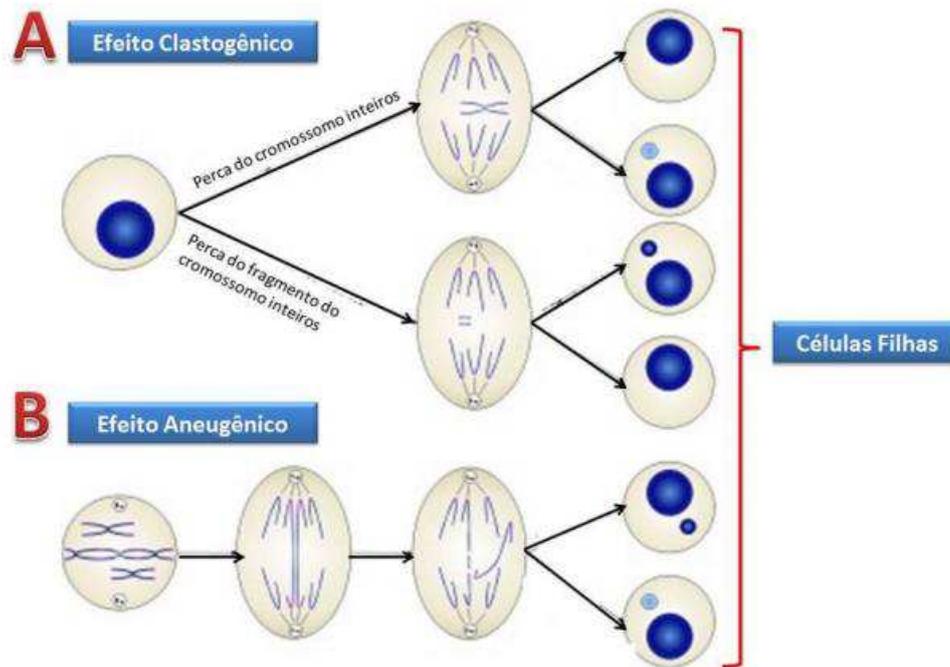


Figura 2: Formação de micronúcleo por efeitos, (A) clastogênico e (B) Aneugênico. Fonte: Cabral, 2014.

O teste de micronúcleo constitui uma ferramenta sensível para o monitoramento de quebras cromossômicas, além de permitir análise de efeitos no fuso mitótico. Diante das vantagens apresentadas, o teste é considerado eficiente e adequado para monitoramento de ambientes aquáticos (HOOFTMAN & RAAT, 1982).

Além de micronúcleos, estudos descrevem a presença de outras alterações morfológicas nucleares em células de peixes, que tem se destacado atualmente devido à expressão simultânea de anormalidades nucleares juntamente aos micronúcleos (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Alterações morfológicas nucleares

Alterações morfológicas nucleares são lesões nucleares induzidas por compostos genotóxicos, mesmo quando não há formação de micronúcleos (Figura 3) (AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

Segundo FENECH (2000) essas anormalidades estão relacionadas a erros que ocorrem durante a mitose ou meiose, a processos de morte celular e a mutagenicidade e genotoxicidade de contaminantes ambientais.

As alterações nucleares já encontradas foram descritas por Carrasco *et al.* (1990) e classificadas em quatro categorias, caracterizadas como: (1) Blebbed: núcleos com uma pequena invaginação da membrana nuclear, ainda ligada ao núcleo, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina, (2) Lobbed: núcleos com invaginações mais largas e não tão definidas como as descritas para blebbed, (3) Vacuolated: núcleos que apresentam uma região que lembra vacúolos em seu interior. Estes apresentam ausência de qualquer material visível em seu interior, (4) Notched: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes não possuem nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear, e (5) Binúcleo: dois núcleos, bem definidos e chamados de binúcleo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA/Universidade Federal da Grande Dourados – Protocolo nº10/2005). O experimento foi realizado no Laboratório de Mutagênese Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Coleta das amostras

Amostras de água foram coletadas no período de estiagem (Junho) e alta pluviosidade (Novembro) de 2015, em nove pontos do Rio Dourados (3 em regiões próximas da nascente, 3 ao longo do curso do Rio e 3 próximos da foz no Rio Ivinhema) (Figuras 4 e 5), e posteriormente encaminhadas ao laboratório de pesquisa para realização dos bioensaios.

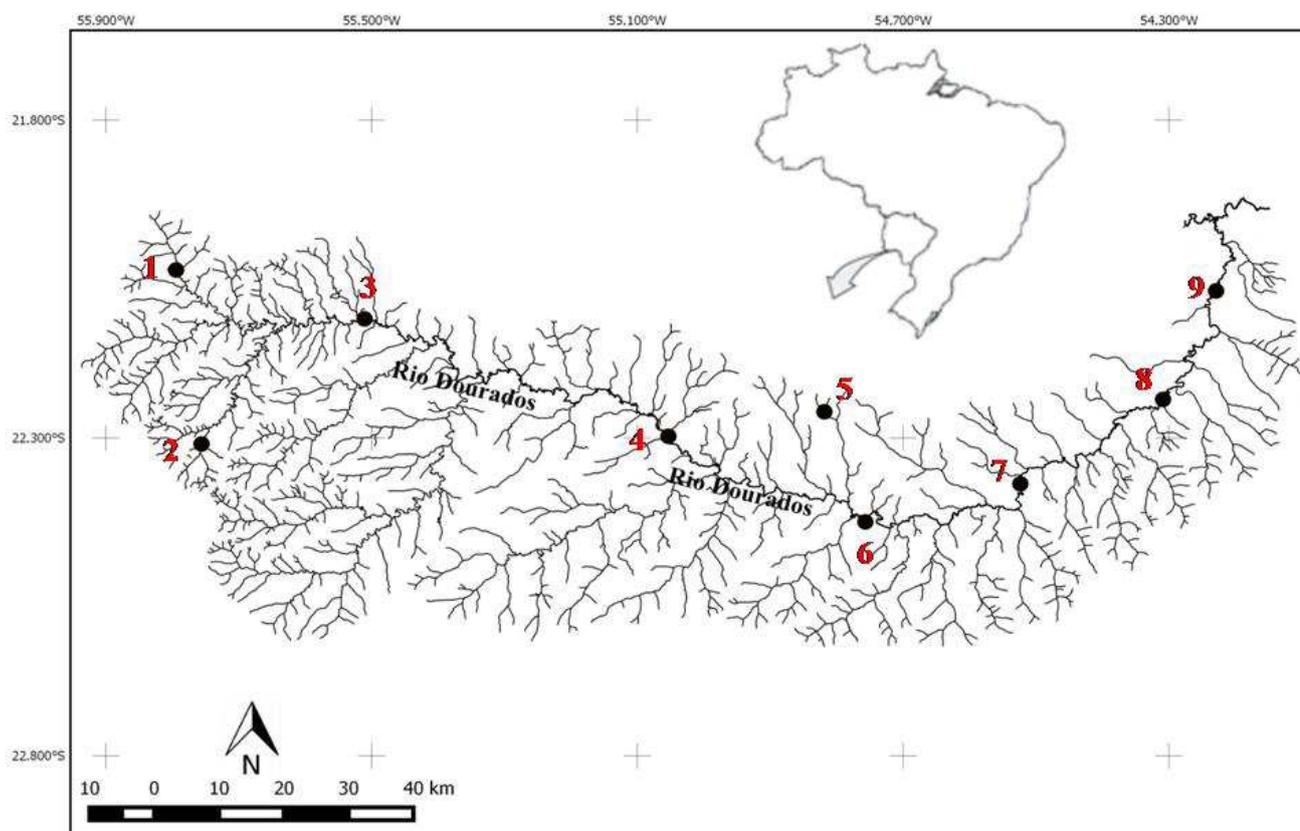


Figura 4: Mapa do Rio Dourados, MS, ilustrando os pontos amostrais. Fonte: Finoto, 2016.



Figura 5: Imagens referentes aos pontos de coleta ao longo do Rio Dourados; 1, 2 e 3) Próximos da nascente; 4, 5 e 6) Ao longo do Rio; 7, 8 e 9) Próximos da foz no Rio Ivinhema. Fonte: Spósito, 2015.

Dados referentes à temperatura (°C) da água e chuvas (mm) nos períodos de coleta foram obtidos no site da EMBRAPA (2015).

Dados Físico-químicos da Água

Parâmetros referentes ao pH e oxigênio dissolvido (mg/L O₂) foram mensurados com auxílio de sonda multiparâmetro YSI Professional Plus.

Período de exposição

Amostras de água provenientes dos diferentes pontos de coleta foram acondicionadas em nove aquários de vidro, devidamente aerados, à temperatura ambiente juntamente com os peixes. Para realização dos bioensaios foram utilizados peixes (*Astyanax lacustris*) adquiridos em piscicultura local. Os peixes permaneceram nos aquários por um período de exposição de 72 horas (Figura 6).



Figura 6: Aquário contendo amostra de água com peixes adquiridos em piscicultura. Fonte: Spósito, 2015.

Confecção das lâminas

Após período de exposição, cinco peixes foram anestesiados em água gelada, e com auxílio de tesoura cirúrgica foi realizado corte na nadadeira caudal para coleta de sangue destinado ao esfregaço para contagem dos danos genéticos.

Para cada peixe foram realizadas duas extensões sanguíneas (duas lâminas), totalizando dez lâminas por ponto. Posteriormente as lâminas foram fixadas com álcool etílico (PA) e colocadas para secar.

A coloração das lâminas procedeu com etapa de hidrólise em HCl por 10 minutos a 60°C no banho-maria, seguido por lavagem por 3 minutos em H₂O destilada (procedimento realizado 3 vezes). As lâminas foram coradas com Reativo de Schiff “overnight”, decorrido o tempo de coloração, as lâminas foram enxaguadas em H₂O destilada para retirar o excesso de corante.

Posteriormente foi realizada etapa de contra-coloração com Fast Green por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas para secar. De cada lâmina foram contadas 1000 células em microscópio óptico Nikon no aumento de 1000X. Os danos genéticos analisados foram: Invaginação nuclear (IN), núcleo lobulado (NL), células sem núcleo (CSN), citoplasma vacuolizado (CV), célula binucleada (CB), núcleo vacuolizado (NV), célula com micronúcleo (MNC), ponte neoplasmática (PN) e brotamento nuclear (BN) (Figura 7).

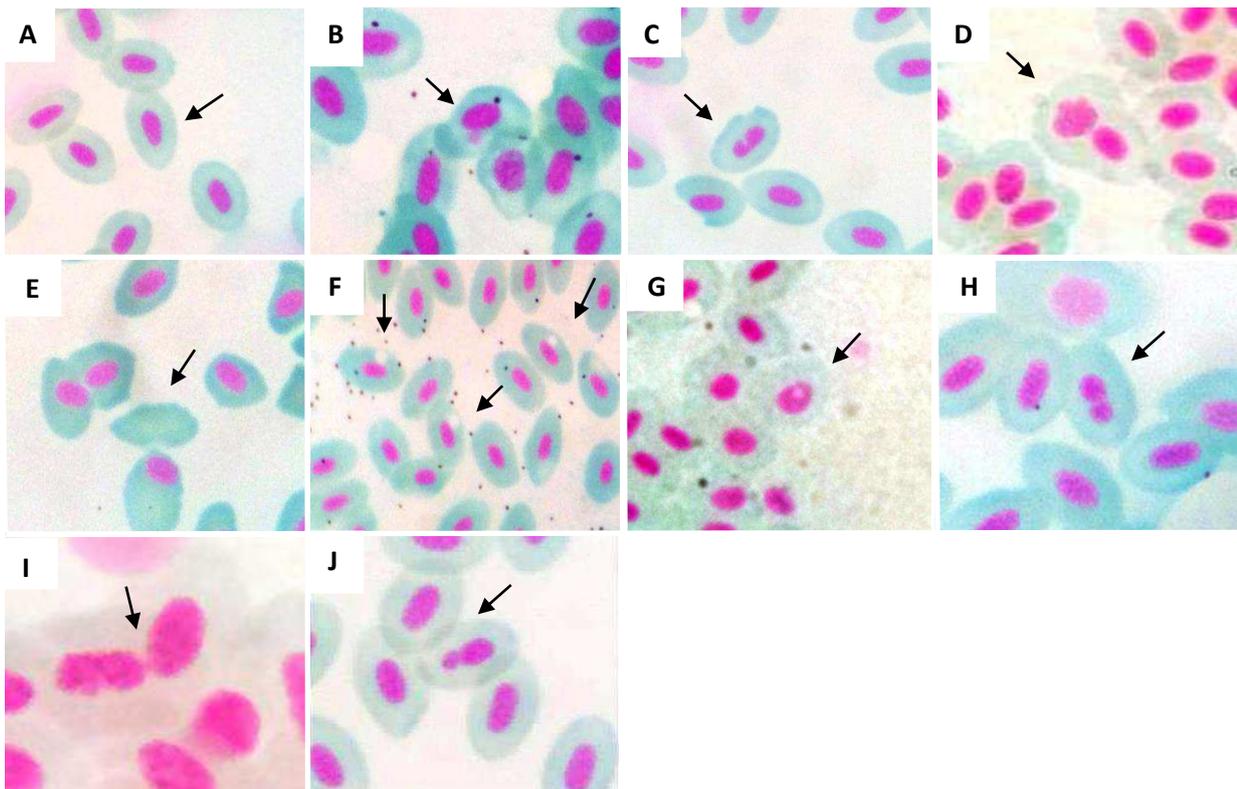


Figura 7: As setas indicam as alterações morfológicas nucleares encontradas no presente estudo. A) Célula normal B) Célula com micronúcleo C) Invaginação nuclear D) Núcleo lobulado E) Célula sem núcleo F) Citoplasma vacuolizado G) Núcleo vacuolizado H) Célula binucleada I) Ponte neoplasmática J) Brotamento nuclear. Fonte: Spósito, 2016.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo sistema R, a partir da média dos dados obtidos na contagem das lâminas. Os resultados foram submetidos à variância paramétrica e não paramétrica. Sendo enquadrados como não paramétricos, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média dos dados de chuvas referentes às 72 horas, 7 e 15 dias antecedentes aos períodos de coleta foi demonstrada na tabela 1.

Tabela 1: Média de chuvas nos períodos antecedentes às coletas.

Período	Chuvas	Tempo
Estiagem (Jun)	0 mm	72 horas
	0 mm	7 dias
	2,02 mm	15 dias
Alta pluviosidade (Nov)	29,93 mm	72 horas
	15,26 mm	7 dias
	8,74mm	15 dias

Os resultados da análise de oxigênio dissolvido (OD) e pH das amostras coletadas ao longo do Rio Dourados, nos períodos de estiagem e alta pluviosidade, foram apresentados na Tabelas 2.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos obtidos a partir das águas coletadas nos pontos amostrais.

Período		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Jun	OD	106% e 9.95mg/L	119.6% e 11.08mg/L	107% e 9.88mg/L	108% e 10.8mg/L	65.4% e 5.69mg/L	117.1% e 10.81mg/L	107.5% e 9.76mg/L	98.1% e 8.96mg/L	108.1% e 9.84mg/L
	pH	10.12	8.50	10.04	9.70	8.10	8.18	5.90	5.98	5.92
Nov	OD	75.5% e 6.53 mg/L	90.2% e 7.71 mg/L	73.3% e 6.16 mg/L	73.5% e 6.0195 mg/L	86.2% e 6.93 mg/L	118.3% e 9.63 mg/L	62.2% e 4.86 mg/L	55.8% e 4.53 mg/L	53.3% e 4.29 mg/L
	pH	6.31	6.95	6.05	7.55	7.47	7.25	6.07	6.53	6.5

Nota: OD (Oxigênio dissolvido) não inferior a 4 mg/L, pH (Potencial hidrogeniônico) não inferior a 6,5 (em vermelho) e não superior a 8,5 (em azul). Valores estabelecidos para OD e pH, para águas doces, Classe III, de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005.

O oxigênio dissolvido (OD) é um elemento fundamental no metabolismo dos organismos aquáticos aeróbicos. Em águas correntes, sob condições normais, o conteúdo de oxigênio é alto e varia ao longo dos rios, devido alterações em suas características ambientais em resposta às condições climáticas decorrentes (MAIER, 1987). Para os dados de OD, todos os pontos de coleta das amostras, em ambos os períodos, estavam dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA (Resolução nº 357, Classe III).

No entanto, para potencial hidrogeniônico (pH), foi verificado que no mês de junho os pontos 2, 5 e 6 estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente, bem como os pontos amostrais 2, 4, 5, 6, 8 e 9 no mês de novembro. Porém, os pontos 1, 3 e 4 (junho) apresentam valor superior ao limite aceito pelo CONAMA, resultados que contrapõem os obtidos por Carvalho *et al.* (2000), segundo os autores, meses chuvosos, como o de novembro, tendem ao aumento do pH, devido maior diluição dos compostos dissolvidos e escoamento mais rápido, causado pelo aumento no volume de água que faz com que a acidez diminua. Esse aumento pode produzir alterações histológicas, que afetam o crescimento e o desenvolvimento dos peixes (OSTASZEWSKA *et al.*, 1999).

O aumento do pH, pode proporcionar também, à formação de óxido de cálcio que provoca corrosão do epitélio branquial e das nadadeiras, levando os peixes à morte. Os pontos 1 e 3 apresentaram valores superiores a 9, nesses casos, segundo CETESB (1980), quando há a presença de amônia na água, junto ao pH alcalino, esta tende a ser altamente tóxica.

Já os pontos 7, 8 e 9 (Junho) e 1, 3 e 7 (Novembro) apresentaram valores inferiores aos estabelecidos pela legislação. Segundo Maier (1987) uma pequena diminuição no pH aquático pode estar associada ao aumento no teor de matéria orgânica e ocasionar queda na quantidade de oxigênio dissolvido disponível em corpos d'água. No entanto, em vários estudos realizados em rios no Amazonas e São Paulo, indicam que a tendência observada em rios brasileiros é de pH ligeiramente ácido, sem causar danos ao ambiente aquático (BUENO *et al.*, 2005; HORBE *et al.*, 2005).

De acordo com Waichama (2008), em águas naturais o pH é influenciado pela concentração de H⁺ originado da dissociação do ácido carbônico, que gera valores

baixos de pH, e das reações de íons carbonato e bicarbonato com H₂O, que elevam os valores de pH para a faixa alcalina. Apesar de se inter-relacionarem, as variáveis físico-químicas podem ser influenciadas por outras variantes do meio externo, como por exemplo, o regime de chuvas.

A partir dos resultados de OD e pH, foi possível observar que, mesmo nos pontos que estavam dentro dos limites aceitos pela legislação, no mês de novembro, quase todos os valores apresentaram decréscimo, ou seja, a concentração de OD no geral, diminuiu e o pH ficou mais ácido. Esses dados podem estar diretamente ligados aos resultados obtidos no teste de genotoxicidade, em que o mês de novembro (alta pluviosidade), apresentou maior número de alterações morfológicas nucleares (Tabela 3).

No entanto, o teste de mutagenicidade (MCN) não apresentou diferença estatística entre os nove pontos amostrais analisados e a presença de MCN observados nos períodos em estudo. Os resultados corroboram com os obtidos por Williams e Metcalfe (1992) e segundo o autor, a formação de micronúcleos ocorre espontaneamente em células de peixes, porém essa frequência é relativamente menor em comparação a outros organismos.

Tabela 3: Alterações genéticas em *Astyanax lacustris* avaliadas em água superficial do Rio Dourados – Mato Grosso do Sul/Brasil em Junho e Novembro de 2015.

JUNHO										
Pontos	MCN	IN	NL	CSN	CV	NV	BN	CB	PN	
1	25.5 a	20.5 a	26.5 a	20.5 a	20.3 ab	25.2 a	22.0 a	28.5 a	22.5 b	
2	21.0 a	25.4 a	22.0 a	24.9 a	17.6 b	26.6 a	22.0 a	23.6 a	22.5 b	
3	25.5 a	24.7 a	22.0 a	24.9 a	10.5 ab	25.3 a	26.5 a	24.0 a	22.5 b	
4	21.0 a	25.1 a	22.0 a	24.9 a	20.7 b	25.6 a	26.5 a	24.4 a	22.5 b	
5	25.5 a	20.5 a	22.0 a	25.4 a	33.8 a	16.5 a	22.0 a	28.5 a	22.5 b	
6	21.0 a	24.7 a	22.0 a	24.9 a	23.0 ab	26.0 a	22.0 a	19.5 a	27.0 a	
7	21.0 a	20.5 a	22.0 a	20.5 a	23.4 ab	21.0 a	22.0 a	19.5 a	22.5 b	
8	21.0 a	20.5 a	22.0 a	20.5 a	23.8 ab	21.6 a	22.0 a	19.5 a	22.5 b	
9	25.5 a	25.1 a	26.5 a	20.5 a	33.9 a	20.1 a	22.0 a	19.5 a	22.5 b	
NOVEMBRO										
Pontos	MCN	IN	NL	CSN	CV	NV	BN	CB	PN	
1	22.4 a	12.2 c	19.0 c	22.0 a	14.1 b	18.0 a	26.2 a	16.0 b	22.0 a	
2	27.8 a	28.3 ab	19.0 c	22.0 a	20.4 ab	26.3 a	20.3 a	16.0 b	22.0 a	
3	18.0 a	21.7 abc	19.0 c	26.5 a	15.9 b	15.2 a	19.0 a	16.0 b	22.0 a	
4	22.4 a	24.7 abc	19.0c	22.0 a	15.6 b	21.4 a	19.0 a	16.0 b	22.0 a	
5	22.4 a	19.9 abc	23.2 bc	22.0 a	28.8 ab	25.5 a	22.6 a	19.8 b	22.0 a	
6	22.4 a	19.2 bc	23.2 bc	26.5 a	25.9 ab	20.4 a	16.7 a	26.3 ab	26.5 a	
7	26.8 a	20.6 abc	32.2 ab	22.0 a	23.5 ab	24.5 a	26.2 a	31.2 a	22.0 a	
8	18.0 a	25.1 abc	19.0 c	22.0 a	28.4 ab	27.1 a	26.3 a	30.8 a	22.0 a	
9	26.8 a	35.3 a	33.4 a	22.0 a	34.4 a	28.6 a	30.7 a	34.9 a	26.5 a	

Nota: Célula com micronúcleo (MNC), invaginação nuclear (IN), núcleo lobulado (NL), célula sem núcleo (CSN), citoplasma vacuolizado (CV), núcleo vacuolizado (NV), brotamento nuclear (BN), célula binucleada (CB) e ponte neoplasmática (PN).

O teste de genotoxicidade permitiu constatar que o mês de novembro apresentou maior número de alterações genéticas (IN, NL, CV e CB), em comparação ao mês de junho (CV e PN), como indicado nas tabelas acima, valores destacados em negrito.

Em relação às alterações morfológicas nucleares, no mês de Junho, apenas os pontos 5, 9 (CV) e 6 (PN) diferiram-se estatisticamente dos demais. Resultados similares foram verificados por Da Silva et al. (2014), indicando maior número de danos genotóxicos em peixes durante estações chuvosas, o que pode ser atribuído, à migração dos peixes de locais mais contaminados durante esse período.

Contudo, os resultados estão de acordo com os obtidos por Christofolletti (2008) e sugerem que a precipitação durante períodos chuvosos pode lixiviar contaminantes presentes no solo para o leito dos cursos de água. Além de fazer com que alguns poluentes aprisionados no sedimento dos rios, retornem para a superfície, contribuindo para indução de genotoxicidade e, como consequência, maior comprometimento das águas dos rios por agentes genotóxicos.

No mês de novembro, os pontos 7 e 8 apresentaram diferença estatística para células binucleadas (CB). O ponto 9 também apresentou diferença estatística para CB e para invaginação nuclear (IN), núcleo lobulado (NL) e citoplasma vacuolizado (CV). A presença de um maior número de alterações durante esse mês deve-se a elevada movimentação das águas, devido o período chuvoso, que ocasiona o levantamento de substâncias presentes no local e estas permanecem em contato direto com os organismos vivos, fazendo com que apresentem maior nível de danos genéticos em consequência a essa exposição. Com isso, a partir do estudo foi possível afirmar que o período de chuvas influencia diretamente ambientes aquáticos contaminados, afetando genotóxicamente a biota local (DA SILVA et. al 2014).

O ponto 9 apresentou maior média de alterações morfológicas nucleares, sendo observados danos genéticos em ambos os períodos e permitindo caracterizá-lo como ponto de maior concentração de contaminantes genotóxicos. Essa elevada concentração de contaminantes deve-se à localização do ponto amostral, próximo da foz, onde substâncias advindas de pontos anteriores desembocam. O ponto encontra-se também, próximo a lavouras e com isso, está mais exposto a contaminantes agroquímicos, que interferem diretamente na saúde da biota local.

CONCLUSÃO

O Rio Dourados demonstrou estar impactado por efluentes domésticos, industriais e agroquímicos devido à intensa produção agrícola local, principalmente no período de chuvas, podendo pôr em perigo o material genético dos organismos ali expostos e a saúde do ecossistema local.

Considerando as três variáveis: sazonalidade, interação entre substâncias no local e análise da qualidade da água conforme Resolução 357/2005 (Classe III) do Conama, torna-se necessário realizar monitoramento constante do ambiente, a fim de obter um verdadeiro cenário do potencial genotóxico dos poluentes existentes. Contudo, o biomonitoramento constitui ferramenta competente de auxílio em planos de avaliação da qualidade da água e à potencialidade de recursos enquanto patrimônio natural da humanidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Águas – ANA (2012) Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das Águas (PNQA) 222p.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. (2000). Introduction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, v. 76, p. 177-186.

BOLLER, Kaspar; SCHMID, W. (1970) Chemische mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen hamsters als in vivo-Testsystem. Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. *Humangenetik*, v. 11, n. 1, p. 35-54.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. (2007) Peixes do Pantanal: manual de identificação. Brasília: EMBRAPA, 2 ed., 227 p.

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

BUENO, L.F.; GALBIATTI, J.A.; BORGES, M.J. (2005) Monitoramento de variáveis de qualidade da água do Horto Ouro Verde - Conchal - SP. *Eng. Agrícola*, 25(3): 742-748.

CABRAL, W. B. M. (2014). Análise da genotoxicidade in vivo dos agrotóxicos cioramazina e mancozeb em baixas doses.

CAMPOS, J. A. D. B.; FARACHE FILHO, A.; FARIA, J. B. (2003) Uso de reservatórios domiciliares e conhecimento da população. *Rev. Alim. Nutr.*, v. 14, n.2, p. 171- 175.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 47, p. 2123 -2136.

CARITÁ, R. (2010) Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de água de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do polo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

CARVALHO, A.R.; Schlittler, F.H.M.; Tornisielo, V.L. (2000) Relações da atividade agropecuária com parâmetros físicos químicos da água. *Química Nova*, 23(5): 618-622.

CETESB (1980) Companhia de Tecnologia. Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo In: Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo.

CHRISTOFOLETTI, C.A. (2008) Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas–Biologia Celular e Molecular)–Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2006. Resolução nº357 de 17 de março de 2005.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 46, p. 64-70.

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

DA SILVA (2014) Manuela Dreyer et al. Using multibiomarker approach as a tool to improve the management plan for a Private Reserve of Natural Heritage (RPPN). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 92, n. 5, p. 602-608.

DA SILVA SOUZA, T; FONTANETTI, C.S. (2006) Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters

affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 605, n. 1, p. 87-93.

DE CASTILHOS GHISI, N. et al. (2014) In situ assessment of a neotropical fish to evaluate pollution in a river receiving agricultural and urban wastewater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 93, n. 6, p. 699-709.

DE PAULA, S. M. (2011) Qualidade da água do Rio Dourados-MS–Parâmetros físico-químicos, microbiológicos e higiênico sanitários. 2011. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD. Dourados. 87p.

GALVAN, G. L. (2011) Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae).

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia, PUCRS, Série Zoologia, Porto Alegre*, v. 13, p. 65-88.

EMBRAPA - Guia Clima (2015). Disponível em <<http://www.cpa0.embrapa.br/clima/?lc=site/banco-dados/construtor-basico>>. Acesso em: 03 de Dezembro de 2016.

FAIRBAIRN, D.W; Olive, P.L; O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339:37–59.

FENECH, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81- 95.

HEDDLE, J.A., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MCGREGOR, J.T., NEWELL, G.W., SALAMONE, N.F.(1983) The induction of micronuclei as a measure genotoxicity. *Mutat Res* 123: 61-118.

HOLLAND, N. BOLOGNESI, C. KIRSCH-VOLDERS, M. BONASSI, S. ZEIGER, E. KNASMUELLER, S. FENECH, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mut Res* 659:93-108.

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

HORBE, A.M.C.; GOMES, I.L.F.; MIRANDA, S.F.; SILVA, M.S.R. (2005) Contribuição à hidroquímica de drenagens no Município de Manaus - AM. *Acta Amazonica*, 35(2): 119-124

HOSHINA, M.M. (2005) Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de efluentes de refinaria de petróleo, por meio dos sistemas testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística Agricultura (2013). Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=50&search=mato-grosso-do-sul>>. Acesso em 10 fev 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística Agricultura 2016. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/BKK>. Acesso em 01 fev 2017.

Instituto do Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul – IMASUL (2010) Relatório de qualidade das águas superficiais do Estado de Mato Grosso do Sul 222p.

MAIER, M.H. (1987) Ecologia da bacia do rio Jacaré Pepira (47°55' – 48°55'W; 22°30' – 21°55'S – Brasil): qualidade da água do rio principal. *Ciência e Cultura*, 39(2): 164-185.

NATARAJAN, A.T. (2002) Chromosome Aberration: Past, Present And Future. Mutation Research, Orlando, v. 504, n.6, p. 3 -16.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. (2004) Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia, v. 21, p. 207-218.

OSTASZEWSKA, T. et al. (1999) Histopathological changes in juvenile carp *Cyprinus carpio* (L.) continuously exposed to alkaline levels of water pH, from hatching. Arch. Pol. Fish., Olsztyn, v. 7, no. 2, p.329-342.

PHILIPPI, J.A.; PELICIONI, M. (2005) Educação Ambiental e Sustentabilidade. Barueri, SP: Manole.

RAMIREZ, A. (2000) Análise de células metanucleadas de alcoólicos portadores de carcinomas orais. Diss. Universidade de São Paulo.

RAMSDORF, W.A; FERRARO, M.V.M; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A; CESTARI, M.M (2009) Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. Environ Monit Assess 158:77-85.

RIBEIRO, L. R. (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, p. 173-200.

VAN DER OOST, J.BEYER, N.P.E. (2003) Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, Environ. Toxicol. Pharmacol. 13. 57-149.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp. B e A. *altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri-UFPR). Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, v. 39, 2007.

RESOLUÇÃO, Nº. 357, de 17 de Março de 2005. CONAMA-Conselho Nacional de Meio Ambiente.

RESOLUÇÃO, nº 132, de 22 de fevereiro de 2016. ANA-Agência Nacional de Águas, Documento nº 00000.023580/2016-89.

Secretaria de Estado de Meio Ambiente (2000). MATO GROSSO DO SUL. Fundação Estadual de Meio Ambiente Pantanal. Coordenadoria de Recursos Hídricos e Qualidade Ambiental. Divisão Centro de Controle Ambiental. Microbacia Hidrográfica do Rio Dourados: diagnóstico e implantação da rede básica de monitoramento da qualidade das águas. Campo Grande, MS.

SCHMID, W. (1975); The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9-15.

TERA (2015) Classificação dos rios: classes e condições para lançamento de efluentes. Acesso em: <http://www.teraambiental.com.br/blog-da-tera-ambiental/classificacao-dos-rios-classes-e-condicoes-para-lancamento-de-efluentes>.

T.ÇAVAS, S. ERGENE-GOZUKARA (2005) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquat. Toxicol.* 74. 264-271.

VAN DER OOST, Ron; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico PE. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57-149.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.90, p.42-51, 2008.

VON SONNTAG, C. (1987) *The chemical basis of radiation biology* (pp. 353-374). London: Taylor & Francis.

WAICHAMA, V. (2008) Influência da precipitação na qualidade da água do Rio Purus.

WILLIAMS, R.C., METCALFE, C.D. (1992) Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout, *Aquatic Toxicology*, 23, 193-202.