

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
Meio Ambiente e Recursos Hídricos

**Caracterização dos efeitos genotóxicos induzidos por amostras de água
provenientes do ribeirão José Pereira, sul de Minas Gerais: subsídio para
monitoramento da qualidade da água.**

Stéphanie Caroline Machado Thomaz da Silva

Itajubá, setembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Stéphanie Caroline Machado Thomaz da Silva

Caracterização dos efeitos genotóxicos induzidos por amostras de água provenientes do ribeirão José Pereira, sul de Minas Gerais: subsídio para monitoramento da qualidade da água.

Área de concentração: Ecologia Aplicada (2.05.03.00-8)

Orientadora: Profª Drª. Ana Lúcia Fonseca

Setembro de 2015

Itajubá

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Stéphanie Caroline Machado Thomaz da Silva

**Caracterização dos efeitos genotóxicos induzidos por amostras de água
provenientes do ribeirão José Pereira, sul de Minas Gerais: subsídio para
monitoramento da qualidade da água.**

Dissertação aprovada por banca examinadora em 29 de setembro de
2015, conferindo ao autor o título de Mestre em Ciências em Meio
Ambiente e Recursos Hídricos

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª. Ana Lúcia Fonseca (Orientador – UNIFEI)

Prof^ª Dr^ª. Andreia Arantes Borges (Co-orientador – UNIFEI)

Prof^ª Dr. Flávio Soares da Silva (UNIFEI)

Prof^ª Dr^ª. Juliana da Silva (ULBRA)

Itajubá

2015

Dedicatória

Aos meus pais, Gilmar César e Martha Maria sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

As minhas irmãs Giórgia e Camila e todos familiares estiveram sempre ao meu lado.

Ao meu marido e amigo Fernando, pela compreensão e ajuda em todos momentos quando precisei.

As professoras Ana Lúcia Fonseca, Emilene Arusiewicz, Andreia Borges que me acolheram e me proporcionaram todo conhecimento durante minha trajetória no mestrado.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sua presença em minha vida, manifestada nas pessoas que foram tão importantes para desenvolvimento e a realização desse trabalho.

A toda minha família que foram compreensivos e me ajudaram nesta caminhada, em especial aos meu pais Gilmar, Martha, minhas irmãs Giórgia e Camila.

Ao meu marido Fernando, que sempre esteve ao meu lado, me incentivou e com muito carinho me auxiliou nos estudos, esteve presente em todos momentos, obrigada.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Fonseca, por ter me acolhido em sua linha de pesquisa, por conduzir-me com carinho, dedicação e muito incentivo nas horas mais difíceis da minha trajetória, me guiando com maestria na busca de novos conhecimentos.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Andréia Arantes Borges pelo auxílio na compreensão da técnica, nas orientações e dúvidas sanadas durante minha trajetória do curso,

A minha professora Prof.^a Emilene Arusievicz me auxiliou no desenvolvimento da técnica e se dispôs a me ensinar com todo empenho,

Aos amigos e técnicos que laboratório da UNIFEI em especial João Vitor Rocha e Elaine Dias de Faria, pela disponibilidade em me ajudar e auxílio no desenvolvimento do trabalho pois sem vocês nada seria completo,

Ao técnico Alexandre Germano que esteve sempre disposto nas saídas de campos e me auxiliou na discussão de inúmeros pontos do trabalho e ao técnico Paulo Marques pelas ajudas em esclarecimentos de dúvidas,

A aluna de iniciação científica Tais Marcellini, que com muito carinho, empenho e dedicação, esteve comigo nos momentos mais difíceis e também nos momentos alegres, desde o início do experimento até final, meus eternos agradecimentos,

A todos os professores do MEMARH pois contribuíram para minha formação e hoje carrego comigo uma grande bagagem de conhecimento, e sei que ainda há muito para enriquecer,

Aos amigos que conquistei durante *TODO* período do curso, e com certeza terei para vida toda,

Obrigada a todos que me apoiaram, aos amigos e familiares, pois por muitas vezes pensei em desistir, mas que em algum momento entraram em minha vida pela graça de Deus, lançando palavras de otimismo,

A CAPES, pela bolsa de estudos, pois através desta foi possível dedicar-me exclusivamente ao desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

*“Não haverá borboletas se a vida não passar
por longas e silenciosas metamorfoses”*



Rubem Alves

Lista de Figuras

Figura 1 – Mapa da micro bacia do ribeirão José Pereira – Itajubá - Minas Gerais	20
Figura 2 – Níveis de organização biológica	25
Figura 3 – Estrutura do DNA	26
Figura 4 – Células de fígado de <i>Danio rerio</i> expostos com atrazina e vários tipos de dano (A) Dano 0, (B) Dano 1, (C) Dano 2, (D) Dano 4.	30
Figura 5 – Diagrama da aplicação do ensaio cometa em diferentes organismos.....	31
Figura 6 – Exemplar de <i>Danio rerio</i>	33
Figura 7 - Pontos de coleta: (P1), ponto 1, (P2), ponto 2, (P3) ponto 3, (P4) ponto 4 - Micro bacia do Ribeirão José Pereira – Itajubá – MG (2014).....	35
Figura 8 - Exposição <i>Danio rerio</i> com água de diferentes pontos de coleta da micro bacia (2014).....	38
Figura 9 - Alimentação e troca de água dos aquários/ Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei (2014).....	38
Figura 10 - Realização do ensaio cometa - luz vermelha indireta /Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei (2014).....	39
Figura 11 – Volume total de precipitação (mm) no ano de (2014) na cidade de Itajubá/MG (2014).....	43
Figura 12 –Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - Das amostras de água coletada nos pontos amostrais A – (P1) – ponto controle, B – (P2) – Agricultura/pasto, C – (P3) – Confluências de áreas adjacentes, D (P4) – Área urbana – micro bacia do José Pereira-MG, no mês de agosto 2014 (2014).....	48
Figura 13 – Espectro - presença de Metais - Amostras: A – (P1) – ponto controle, B – (P2) – Agricultura/pasto, C – (P3) – Confluências de áreas adjacentes, D (P4) – Área urbana – micro bacia do José Pereira-MG no mês de agosto 2014 (2014).....	49
Figura 14 - Cromatograma obtido no GC/MS das Amostras: A – (P1) – ponto controle, B – (P2) – Agricultura/pasto, C – (P3) – Confluências de áreas adjacentes, D (P4) – Área urbana – micro bacia do José Pereira-MG no mês de agosto 2014.....	51
Figura 15 – Índices de dano (ID – 0 – 400), estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª campanhas com exposição de células branquiais de <i>Danio rerio</i> em amostras de água da Micro bacia do ribeirão José Pereira por de 48h (A e B), 72h (C e D), 10 dias (E e F) (2014).....	53

Figura 16 – Índice de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a Campanha com exposição de 48horas, com células branquiais de <i>Danio rerio</i> expostas às amostras de água da Micro bacia do Ribeirão José Pereira (2014).....	56
Figura 17 – Índice de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a Campanha com exposição de 72horas, com células branquiais de <i>Danio rerio</i> expostas às amostras de água da Micro bacia do José Pereira (2014).....	57
Figura 18 – Índice de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a Campanha com exposição de 10 dias, com células branquiais de <i>Danio rerio</i> expostos às amostras de água da Micro bacia do José Pereira (2014).....	57
Figura 19 - Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a campanhas com exposição de células branquiais de <i>Danio rerio</i> em amostras de água da Micro bacia do ribeirão José Pereira por de 48h (A e B), 72h (C e D), 10 dias (E e F) (2014).....	59
Figura 20 - Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a Campanha com exposição 48horas, em <i>Danio rerio</i> com água da Micro bacia do José Pereira (2014).....	60
Figura 21 - Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a Campanha com exposição 72horas, em <i>Danio rerio</i> com água da Micro bacia do José Pereira (2014).....	60
Figura 22 – Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1 ^a e 2 ^a Campanha com exposição 10 dias, em <i>Danio rerio</i> com água da Micro bacia do José Pereira (2014).....	61

Lista de Tabela

Tabela 1 – Localização dos pontos amostrais na micro bacia do ribeirão José Pereira – Itajubá - Minas Gerais	36
Tabela 2 – Metodologias utilizadas nas quantificações das variáveis químicas, microbiológicas e metais com amostras de água provenientes da micro bacia do ribeirão José Pereira/Itajubá/MG.....	41
Tabela - 3 – Valores das variáveis físicas e químicas obtidas <i>in situ</i> com auxílio da sonda Multiparâmetro <i>HANNA</i> em amostras de água nos quatro pontos amostrais na micro bacia do Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG, nos meses de Agosto e Outubro de 2014.....	44
Tabela 4 – Valores das variáveis físicas, químicas e biológicas, obtidas com as amostras de água coletadas na micro bacia do ribeirão José Pereira nos meses de agosto (primeira campanha) e em outubro (segunda campanha) em 2014.....	47
Tabela 5 – Valores do Índice de Estado Trófico/ Fósforo Total - (IET), obtidas com as amostras de água coletadas na micro bacia do ribeirão José Pereira nos meses de agosto (primeira campanha) e em outubro (segunda campanha) em 2014.....	48

Sumário

1 – Introdução	13
2 – Objetivos	
2.1 – Geral	16
2.2 – Específicos	16
3 – Referencial bibliográfico	
3.1 – Bacia hidrográfica: conceito e reflexos da ocupação	17
3.2 – Micro bacia do ribeirão José Pereira – Itajubá – Minas Gerais	18
3.3 – Biomonitoramento	21
3.4 – Genotoxicidade	26
3.4.1 – Ensaio cometa	29
3.5 – Organismo teste	32
4 – Materiais e métodos	
4.1 – Campo: caracterização das amostras de água e caracterização das variáveis físicas e químicas	35
4.2 – Laboratórios: Aclimação dos exemplares de <i>Danio rerio</i>	37
4.3 – Exposição de <i>Danio rerio</i> às amostras de água	37
4.4 – Ensaio de Genotoxicidade: cometa	38
4.5 – Variáveis Químicas e Biológicas	41
4.6 – Índice de Estado Trófico/IET – Rios	42
4.7 – Análise estatística	42
5.0 – Resultados	
5.1 – Variáveis Físicas e Químicas: <i>in situ</i>	42
5.2 – Variáveis Físicas e Químicas: Laboratório	44
5.3 – Ensaio cometa	52
6.0 – Conclusões	62
7.0 – Referências Bibliográficas	63

Caracterização dos efeitos genotóxicos induzidos por amostra de água provenientes do Ribeirão José Pereira - Sul de Minas Gerais: subsídio para monitoramento da qualidade da água.

Resumo

A micro bacia do ribeirão José Pereira localizada na cidade de Itajubá, sul de Minas Gerais/Brasil, é responsável por parte do abastecimento público da cidade, pois nela está inserida a reserva biológica Serra dos Toledos, onde localiza-se o ponto de captação de água da cidade. Portanto sua conservação é de extrema importância regional. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade da água em quatro pontos amostrais de diferentes graus de impacto, por meio do ensaio genotóxico do tipo cometa com células branquiais de *Danio rerio*. Para tanto, exemplares adultos de *Danio rerio*, foram expostos as amostras de água em dois tempos amostrais (Agosto e Outubro/2014): P1 (Ponto Controle- abastecimento de água para consumo humano); P2 (Pastagem/agricultura); P3- confluência com outros afluentes e agricultura e P4- área urbana. Foram utilizados 7 exemplares de *Danio rerio*, em três tempos de exposição: 48h, 72h e 10dias. Foram coletadas as amostras das células branquiais, para a estimativa de danos de DNA de acordo com Lemos et al. (2005), Da Silva et al. (2007), Figueroa (2013). De forma complementar foram quantificadas as seguintes variáveis físicas e químicas nas amostras de água: Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química do Oxigênio (DQO), clorofila *a*, fósforo dissolvido e total, amônia, nitrito, nitrogênio total, carbono total, sólidos totais, coliformes totais conforme APHA, 2012; Valderrama, 1981; Golterman et al, 1978, e apenas uma análise qualitativa de metais e compostos orgânicos em Agosto de 2014. *In situ* foram determinadas as variáveis pH, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Oxigênio Dissolvido (mg.L^{-1}) e condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) além do cálculo do Índice de Estado Trófico (IET), conforme Lamparelli, 2004. Os resultados indicaram um declínio nos valores de pH e oxigênio dissolvido, e um aumento gradativo nos valores de condutividade, sólidos totais e coliformes fecais do (P1) ao (P4) nos dois tempos amostrais. Tais resultados reforçam a influência antrópica na região urbanizada. No entanto, as variáveis DBO, DQO, Clorofila *a*, Nitrito, Nitrogênio, se encontram dentro dos parâmetros, para rio Classe II, conforme CONAMA 357/2005. Efeitos genotóxicos foram observados nas células branquiais de *Danio rerio* a amostra de água coletada em Outubro/2014 proveniente do ponto 2 (agricultura/pastagem) no tempo de exposição de 48horas. Porém este dano pode ter sido reparado ou mesmo ocorrido a morte celular, uma vez que o mesmo não foi detectado nos tempos de exposição seguintes. Estes resultados foram confirmados por teste Dunnet's e Tukey ($p < 0,05$). O trecho do rio avaliado, foi classificado como ultraoligotrófico. Trata-se dos primeiros resultados de qualidade de água analisados na presente micro bacia e que indicam a possibilidade de inserção da abordagem genotóxica em programas de biomonitoramento em pequenas bacias hidrográficas.

Palavra chave: Ensaio cometa, variáveis físicas e químicas, biomonitoramento.

Characterization of genotoxic effects induced by water sample from the Ribeirão José Pereira - South of Minas Gerais: allowance for monitoring water quality.

Abstract

The small watershed of the river José Pereira located in Itajubá, south of Minas Gerais/Brazil, is responsible for the public supply of the city and inserted into the biological reserve Toledos mountains, although its conservation is extremely important for the region. Thus, the present study aims to assess the quality of the water in four sampling of different degree of impact through genotoxic test of comet type in gill cells of *Danio rerio*. For many, adult exemplary of *Danio rerio*, were exposed the water samples in two sampling times (August and October / 2014) from different sampling points: P1 (Control- point of water supply for human consumption); P2 (Pasture / agriculture); P3 confluence with other tributaries and agriculture and P4 urban area. 7 copies of *Danio rerio* were used in three exposure times: 48, 72hours and 10days. The gill cells samples were collected to estimate the DNA damage according to Lemos et al. (2005), Da Silva et al. (2007), and Figueroa (2013). In complementarily way were quantified the following physical and chemical variable in water samples: Biochemical Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), chlorophyll a, phosphorus dissolved and total, ammonia, nitrite, total nitrogen, total carbon, total solids, total coliforms as APHA, 2012; Valderrama, 1981; Golterman et al, 1978 among others, and only a qualitative analysis of metals and organic compounds in August 2014. *In situ* variable were determined pH, temperature (°C), dissolved oxygen (mg L⁻¹) and conductivity (μS.cm⁻¹) plus the calculation the Trophic State Index (EIT), as Lamparelli, 2004. The results indicated a decline in pH and dissolved oxygen of (P1) to (P4), and a gradual increase in the conductivity values, total solids and fecal coliforms of (P1) to (P4) in the two sampling times. In tests performed in the laboratory, there is an increase of the total coliforms (P1) to (P4). These results reinforce the anthropogenic influence in the urbanized area. However, the variable BOD, COD, chlorophyll a, nitrite nitrogen, are within the parameters for River Class II, as CONAMA 357/2005. Genotoxic effects were observed in gill cells of zebrafish water sample collected in October / 2014 from point 2 (agriculture / pasture) in exposure time of 48 hours. However, this may damage has been repaired or even cell death occurred since it was not detected in the following exposure times. These results have been confirmed by Dennett's test, and Tukey test (p <0.05). The stretch of river assessed was classified as ultra-low in nutrients. These are the first results of water quality analyzed in this micro basin and indicating the possibility of inclusion of genotoxic approach to biomonitoring programs in small watersheds.

Keyword. Comet assay, physical and chemical variables, biomonitoring.

1. Introdução

Os componentes de uma bacia hidrográfica, podem ser impactados devido à ação antrópica, com os interferentes oriundos principalmente de ações industriais e urbanas. Tais impactos provocam alterações no ecossistema aquático, porém podem ser de maior magnitude em pequenas bacias hidrográficas. Para tanto, a conservação de micro bacia se faz necessário envolvendo várias ferramentas para o monitoramento. De acordo com Tucci et al. (2000), é essencial a preservação das micro bacias, pois pequenos acidentes podem resultar em danos irreversíveis.

Neste sentido, se faz necessário à implantação de programas de monitoramento, agregando diferentes abordagens de avaliação, incluindo dados hidrológicos, uso e ocupação do solo, sedimentação dos recursos hídricos, bem como variáveis de qualidade da água desses mananciais. Neste contexto, a micro bacia do ribeirão José Pereira/Itajubá, localizada no sul de Minas Gerais, tem sido usada como modelo de experimentação com diferentes abordagens visando a implantação de programas de monitoramento para conservação em pequenas bacias hidrográficas (Projeto: FINEP 3.07.0058/01.12.039600).

No que se refere à qualidade da água destacam-se variáveis físicas, químicas e biológicas. As variáveis físicas e químicas permitem quantificar os compostos presentes na água, porém não se sabe os efeitos que possíveis poluentes, bem como a sua disponibilidade, possam desencadear nos organismos aquáticos. Os programas de biomonitoramento, consistem em avaliar o ambiente utilizando organismos sensores em diferentes abordagens, tais como: uso das comunidades residentes, ou organismos cultivados em laboratórios para ensaios ecotoxicológicos sendo este estabelecido pela Resolução Federal do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 357/2005.

Afim de garantir a preservação do ecossistema, os ensaios ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, aos quais respondem a um limite de tolerância ecológica em resposta a algum poluente, seja em alterações fisiológicas, morfológicas ou comportamentais (MAGALHÃES et al., 2008).

No presente estudo, além da caracterização de algumas variáveis físicas e químicas, foi realizado ensaio ecotoxicológico (citogenético) comumente conhecido como *ensaio cometa*, com o peixe *Danio rerio*, como organismo sensor. A proposta foi avaliar a possibilidade do uso desta abordagem, uma vez que os organismos foram

expostos às amostras de água provenientes da micro bacia do ribeirão José Pereira/MG, com diferentes graus de impacto: pastagem, agricultura, área urbana, além do local controle (captação de água para abastecimento público pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais- COPASA/Itajubá).

O uso de peixes como bioindicadores tem sido utilizado desde 1975 como proposta do Comitê Técnico de Qualidade das Águas da Companhia de Saneamento Ambiental de São Paulo (CETESB), aliado à Associação Brasileira de Normas Técnicas. (ABNT) (MAGALHÃES et al., 2008). Além disso, os peixes representam o grupo de maior diversidade dentre os vertebrados (JESUS et al., 2008) com grande capacidade de adaptação aos diferentes poluentes derivados principalmente de atividades sanitárias e industriais. Tais poluentes podem afetar organismos em vários níveis de organização biológica, desde uma molécula até comunidades, sendo os peixes excelentes representantes. Esses contaminantes, ao serem carregados nos corpos hídricos podem se associar a outros xenobióticos, e resultar em subprodutos potencialmente mais perigosos com capacidade de modificar as atividades metabólicas, bem como o material genético.

A espécie de peixe escolhida para presente estudo foi *Danio rerio*, da família Cyprinidae, descrita por Francis H. Buchanan em 1822. Apesar de se tratar de uma espécie exótica, proveniente do sul e sudeste da Ásia, o organismo foi estabelecido como sensor em avaliações ecotoxicológicas nos trópicos e subtropicais (ABNT/NBR 15088/2011).

O ensaio cometa, é um teste citogenético altamente eficaz e sensível para detecções de lesões primárias do DNA. Tem sido utilizado por vários autores para detecção de exposição a xenobióticos em baixas concentrações com diferentes espécies de peixe como organismos sensores (Lemos et al., 2004; Souza & Fontanetti, 2010; Scalon et al., 2010; Duarte et al., 2012; Figueroa, 2013).

Diante do exposto o presente estudo, teve como objetivo descrever os possíveis efeitos genotóxicos em células *branquiais Danio rerio* provocados pela exposição de amostras de água coletadas em quatro pontos de amostragem de diferentes impactos da micro bacia do ribeirão José Pereira/Itajubá/MG. O intuito desta abordagem foi verificar se esta poderá ser incluída em programas de biomonitoramento, visando a conservação ou restauração de pequenas bacias hidrográficas.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos no presente estudo são pioneiros neste local de estudo, o que poderá trazer também um benefício para o município de Itajubá,

uma vez que, como já mencionado, um dos locais de amostragem selecionado (ponto controle) é utilizado em pequenas proporções, como fonte de abastecimento de água para a população.

2. Objetivos:

2.1- Geral

Avaliar a qualidade da água por meio de variáveis físicas, químicas e ecotoxicológicas (ensaio genotoxicidade), em quatro pontos de amostragem de diferentes impactos (pastagem, agricultura e área urbana), na micro bacia do ribeirão José Pereira/ Itajubá/MG.

2.2- Específicos

- Realizar ensaios do tipo cometa com células branquiais de *Danio rerio* (adultos), após 48, 72 horas e 10 dias de exposição às amostras de água dos diferentes pontos amostrais em duas épocas do ano (Agosto e Outubro/2014);
- Avaliar a viabilidade de implantação dos ensaios genotóxicos em programas de biomonitoramento em pequenas bacias hidrográficas.

3 - Referencial bibliográfico

3.1. Bacia hidrográfica: conceito e reflexos da ocupação

Uma bacia hidrográfica é considerada uma região geográfica delimitada por divisores de água, os quais com as águas da chuva são drenados para relevos mais baixos em uma bacia principal (SANTANA 2003). Os componentes de uma bacia hidrográfica constituem de uma dinâmica entre solo, água, vegetação e fauna, podendo ser influenciados por impactos naturais como intemperismo ou antrópico como o mau uso e ocupação do solo e paisagem. As bacias hidrográficas precisam de planejamento adequado em relação ao uso e a ocupação, a fim de assegurar a qualidade de todo ecossistema (FERNANDES 1998).

O Brasil embora abrigue grande quantidade de água doce em relação ao restante do planeta, cerca de 20%, a população brasileira vive em conflitos em relação ao uso racional, uma vez que a disponibilidade hídrica (região Amazônica) está distante das áreas de maior concentração de pessoas (sul e sudeste do país), além da falta de tratamento dos esgotos domésticos (BARROS et al., 2009). Segundo Tucci et al. (2000) estas concentrações urbanas no entorno dos recursos hídricos consistem em um grande problema, pois ocorre a contaminação das águas superficiais e subterrâneas em decorrência também do lançamento dos despejos industriais e defensivos agrícolas restringindo o seu uso para fins mais nobres, tais como o abastecimento público, a irrigação de hortaliças, a balneabilidade, etc. (ALVES et al., 2008).

Portanto, além do gerenciamento dos recursos hídricos para preservação dos corpos d'água, também é essencial que ocorra a preservação da vegetação do entorno. De acordo com Santana (2003), áreas sem vegetação estão sujeitas as enxurradas e erosões, desta forma a água escoada não favorece reservas subterrâneas nem mesmo reservas no solo, o que compromete a vazão, bem como aumenta a poluição dos corpos hídricos.

A utilização dos recursos hídricos se intensificou após a segunda guerra mundial onde houve expansão da economia, agregada ao maior consumo de energia, abastecimento doméstico e industrial, usos na agricultura e irrigação. Na década de 70 ocorreram as primeiras movimentações ambientalistas afim de preservar e fiscalizar o uso e contaminação dos recursos hídricos. Este movimento com origem no exterior se

solidificou também no Brasil (BARROS et al. 2009, TUCCI 2000). Desde então, foram criadas legislações e normas técnicas sobre controle e uso dos recursos hídricos como por exemplo, a Lei 9433/1997 que estabelece diretrizes para a política Nacional dos Recursos Hídricos, a Resolução CONAMA 357 (2005), do Ministério do Meio Ambiente que classifica os corpos d'água conforme critérios quanto ao uso e estabelece padrões de lançamento para cada Classe.

Em especial, existe uma grande preocupação com a preservação das micro bacias, pois na maioria das vezes, o monitoramento ambiental é feito em áreas de bacias extensas, e a falta de monitoramento nestas áreas pode causar conflitos, uma vez que são essenciais para abastecimento humano.

3.2. Micro bacia do ribeirão José Pereira- Itajubá – Minas Gerais

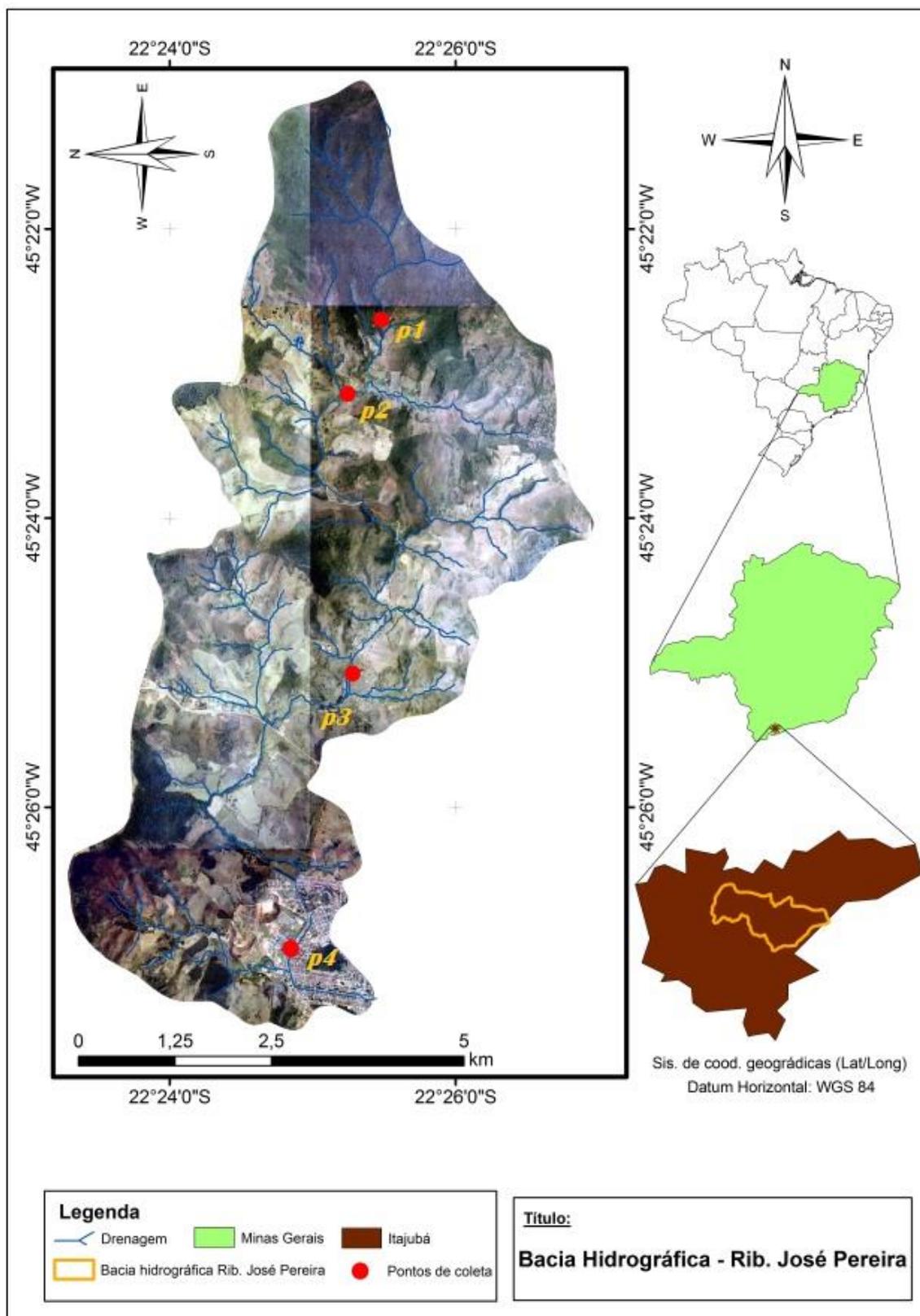
A micro bacia do ribeirão José Pereira localiza-se na cidade de Itajubá, sul de Minas Gerais (Figura 1). Dados do censo de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), diz que o município é composto por 90.658 habitantes, com uma área territorial de 294,835 km².

A micro bacia do Ribeirão José Pereira representa 14% do território municipal e abrange a REBIO – Reserva Biológica - Serra dos Toledos, sendo parte remanescente da Mata Atlântica. Nesta reserva localiza-se a nascente do ribeirão José Pereira cujo potencial hídrico, é responsável por parte do abastecimento público da cidade de Itajubá, agregando grande valor para sociedade. Além disso, parte da cidade de Itajubá cresceu no entorno desta micro bacia, o qual é possível observar diferentes paisagens (FLAUZINO 2012). A preservação da área da Reserva Biológica da Serra dos Toledos é de fundamental importância para a Companhia de Saneamento de Minas Gerais-COPASA, devido aos eventos de enchente que ocorrem esporadicamente em Itajubá. No último evento deste porte ocorrido no ano 2000, esta foi a única fonte de água utilizada pela companhia para o abastecimento da população do município, uma vez que o rio Sapucaí (outro ponto de captação da cidade para abastecimento público), encontrava-se impróprio. Sendo assim, a micro bacia do ribeirão José Pereira representa grande importância social para os munícipes da cidade de Itajubá. Segundo dados da COPASA, cerca de 1/3 do volume de água utilizado para abastecimento público da cidade é captado da Serra dos Toledos. Segundo os dados da companhia, a micro bacia do ribeirão José Pereira foi enquadrada pela Deliberação Normativa - Conselho Estadual de Política

Ambiental (DN COPAM) de nº 33/1998, a qual trata da bacia do rio Grande, estabelecido como rio classe II.

A Figura 1, ilustra a micro bacia do José Pereira com uma pequena extensão de área urbana, porém a cidade cresceu de forma desordenada as margens da mesma. (FLAUZINO 2012). Segundo Batista et al., (2012), a micro bacia apresenta 40km² de área de drenagem, porém sofre com escoamento de chuvas devido a área urbanizada localizada na parte inferior da cidade de Itajubá. Além disso, apresenta vazões máximas na área urbana devido a impermeabilização do solo, o que dificulta o escoamento da chuva e como consequência as frequentes enchentes na região, nos períodos chuvosos.

Figura 1 – Mapa da micro bacia do Ribeirão José Pereira – Itajubá – Minas Gerais.



Fonte. Nunes (2013).

3.3. Biomonitoramento

Dentre os inúmeros compostos tóxicos carregados aos corpos d'água, muitos deles podem provocar efeitos à biota por meio da ingestão, filtração e dispersão na coluna d'água, Costa et al., (2008), o que inviabiliza o uso do recurso hídrico para abastecimento público, irrigação de hortaliças, balneabilidade, etc. Além disso, tais compostos podem ser classificados como agentes genotóxicos apresentando grande risco ecológico.

Para compreender os impactos aos organismos/biota devido à contaminação no meio aquático são adotadas algumas técnicas de biomonitoramento. Esta abordagem consiste em mensurar o nível de perturbação provocada nos organismos vivos nos ecossistemas. Este método é utilizado para avaliação e vigilância, uma vez que os ecossistemas são expostos a inúmeros compostos, causados por ações antrópicas.

O biomonitoramento dos recursos aquáticos, inicialmente foi difundido na Alemanha, os quais avaliavam o nível de poluição, por meio do “*sistema de saprobidade*”, no qual se baseia na presença de microrganismos como bactérias, algas, protozoários, e recebem valores conforme sua tolerância ao ambiente eutrofizado. A partir daí surgiram outras metodologias (MONTEIRO et al., 2008).

Embora exista padrões de lançamentos de efluentes fixadas pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente - Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011, o biomonitoramento auxilia na avaliação do processo de biomagnificação, bioacumulação. Tais processos são definidos como o acúmulo de substâncias tóxicas nos organismos os quais não são excretados, e conseqüentemente são transferidos via cadeia alimentar. Entre estes compostos tóxicos se destacam os elementos utilizados com frequência no campo, como os pesticidas, e os metais pesados. Neste sentido, o biomonitoramento, também auxilia nos estudos de comportamento dos organismos frente à ação dos compostos tóxicos. Tais poluentes podem interferir nas inter-relações, causar extinção de espécie, além do desequilíbrio ecológico. (BUSS 2008). Dentre as inúmeras abordagens de biomonitoramento, a avaliação ambiental, pode ser realizada por diferentes metodologias: as avaliações feitas *in situ* mediante o levantamento de organismos no ambiente com presença/ausência de organismos dominantes ou raros.

As formas normalmente utilizadas para expressar tal abordagem *in situ* são os índices de diversidade biológica, que visa classificar o ambiente com base na comunidade da fauna local (MAGALHÃES 2008). Dentre os organismos observados, se destacam os peixes, algas, protozoários, e também macroinvertebrados bentônicos. Os organismos

bentônicos são utilizados com muita frequência por se tratar de bons indicadores e por apresentar longo ciclo de vida (BUSS et al., 2008). Através do levantamento da diversidade biológica, são atribuídos diferentes valores aos organismos bentônicos, e através da diversidade de espécie no ambiente, é possível mensurar o grau de impacto de um ecossistema.

Normalmente em ecossistemas estáveis como floresta tropical, tais índices serão mais altos se forem encontrados um maior número de espécies raras, e mais baixos em ambientes com desequilíbrio, por apresentarem número maior de espécie dominantes. Sobretudo, em ambiente de maior diversidade também estão sujeitas as mais frequentes perturbações seja por interferência antrópica ou por processos naturais (ODUM 1985). Um dos modelos de índice de diversidade biológica que ganhou destaque é conhecido como BMWP (*Biological Monitoring Working Party*), criado na Grã-Bretanha em 1976, e o outro modelo utilizado em programas de biomonitoramento é o ASPT (*Average Score Per Taxon*). Ambas as metodologias, consistem em atribuir valores para organismos (Buss et al., 2008).

No entanto, atribuir valores e listar as espécies de uma comunidade, requer um pouco de prática e um certo conhecimento. As espécies mais frequentes na comunidade normalmente são as mais tolerantes, e no decorrer do estudo são capturadas também espécies mais raras, os quais são atribuídos maiores valores (TOWNSEND et al., 2008). A avaliação de presença e ausência de espécies em populações ou comunidades tornou-se uma medida confiável para obter dados sobre grau de impacto ambiental, além de serem adotadas em programas de biomonitoramento, são tomadas como metodologias para avaliação de medidas preventivas. No entanto, existem outras técnicas de biomonitoramento (tanto em ambientes aquáticos, como terrestres), cujo objetivo é avaliar as respostas do teor tóxico de múltiplos estressores naturais ou antrópicos nos organismos. Tal abordagem são denominadas de testes/bioensaios ecotoxicológicos (HOFFMAN et al., 2002). Segundo, Rand & Petrocelli, 1985, a terminologia teste é a exposição dos organismos ou células ou tecidos às substâncias puras, fármacos e ensaios ecotoxicológicos ou bioensaios quando se utiliza amostras ambientais.

Os ensaios ecotoxicológicos permitem avaliar as respostas dos organismos em relação a exposição aos agentes tóxicos, os quais auxiliam em estudos de diferentes esferas como: interferência ecológica, saúde humana e do próprio organismo (RAMSDORF, 2012). Além disso, o uso de organismos sentinelas tem sido crescente devido a possível

aplicabilidade em estudos ambientais, devido a sensibilidade dos organismos a diferentes substâncias (MONTEIRO, et al., 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos *in situ* podem ser com espécies isoladas inseridas em câmaras e expostas no ambiente aquático contaminado, ou com várias espécies (mesocosmos). Estes estudos são considerados mais realísticos quando comparado aos ensaios laboratoriais, uma vez que se avalia também a interferência das variáveis ambientais. Tais abordagens são muito utilizadas na avaliação de risco, ou comportamento de uma substância tóxica encontrada na natureza. No entanto, os ensaios em laboratório são normalmente realizados com uma única espécie. Frequentemente utiliza-se microcrustáceo, peixes, algas, bactérias entre outros os quais são expostos a amostra testada, em diferentes concentrações, ou afluente/efluente doméstico ou industrial, em que se observa o comportamento do organismo (ZAGATTO 2003).

O tempo de exposição dos organismos/células ou tecidos é baseado na concentração dos contaminantes ou amostras e a resposta é analisada como de efeitos agudos ou crônicos. No Brasil a Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT é o órgão responsável pela elaboração de protocolos padrão para os ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste (COSTA et al., 2008).

Os testes/ensaios de efeito agudo são caracterizados pela exposição dos organismos, em fases do ciclo de vida consideradas mais sensíveis, em altas concentrações do contaminante tóxico e num curto período de tempo, como por exemplo 24h para micro crustáceos (*Daphnia sp*) e 96 horas para peixes. Normalmente utiliza-se no mínimo cinco (5) concentrações, além do tratamento controle (apenas água de cultivo). São expressos em CE50 (concentração de imobilidade), ou CL50 (concentração letal) a 50% da população (COSTA et al., 2008). Cabe ressaltar que estes valores são fornecidos como um intervalo de concentrações em que ocorre a mortalidade ou imobilidade dos organismos. Trata-se de um ensaio usualmente empregado em estações de tratamento de efluentes domésticos e industriais para avaliar a eficiência da mesma. Também são utilizados para verificar a qualidade da água de rios ou reservatórios que recebem aporte de resíduos industriais e domésticos, além do uso na aquisição de licenças junto aos órgãos ambientais (MAGALHÃES et al., 2008).

Os efeitos de toxicidade crônica são realizados mediante a exposição dos organismos, células ou tecidos em concentrações sub-letais (no mínimo também cinco) para se detectar alterações comportamentais, na sobrevivência, crescimento do corpo ou reprodução dos organismos. O tempo de exposição aborda pelo menos 1/3 do ciclo de

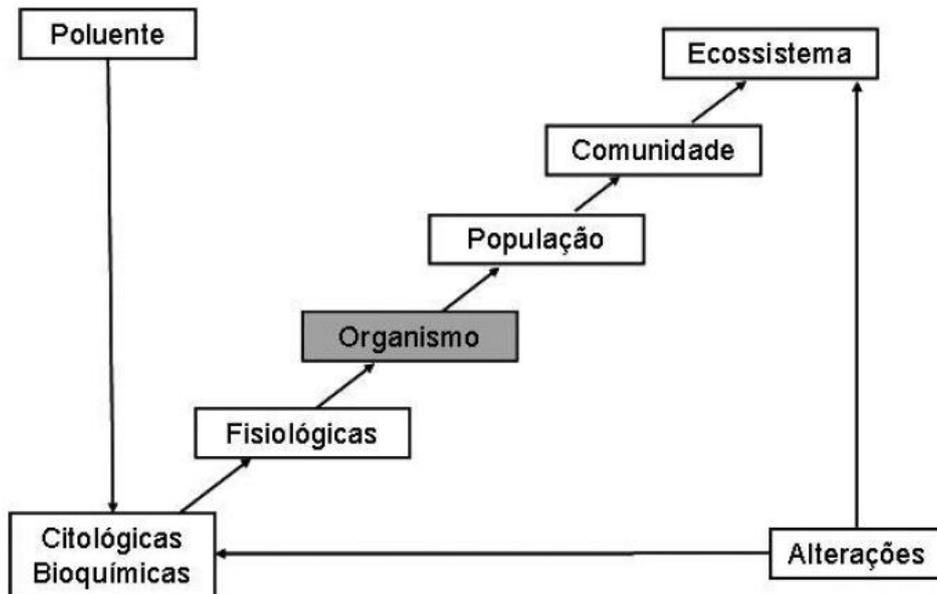
vida da espécie utilizada como organismo-teste (Rand & Petrocelli, 1985). É utilizado em situações em que o ensaio de efeito agudo não é capaz de expressar, ou mesmo para se detectar em quais concentrações estes efeitos ocorrem e que comprometem as funções vitais essenciais dos organismos, bem como a permanência no ambiente.

Os resultados são expressos em CENO (Concentração de efeito não observado), que é a maior concentração utilizada, que não causa efeito deletério, e pelo CEO (Concentração de efeito observado), que é a menor concentração com efeito observado. A média entre os valores de CENO e CEO fornece o valor crônico (VC) (COSTA et al., 2008).

Assim como os ensaios para se avaliar efeitos agudos, os crônicos também fazem parte das diretrizes normativas, como por exemplo a Resolução 357/2005. Portanto, o biomonitoramento, tanto a bioavaliação como os ensaios ecotoxicológicos, são abordagens muito utilizadas no controle de poluição, contaminação ou como ferramenta de vigilância (MAGALHÃES et al., 2008).

Neste sentido, é possível considerar que efeitos sobre a biota aquática são essenciais na avaliação da qualidade da água, além do processo de bioacumulação, (transferência via cadeia alimentar), tais acumulações podem ser de alta toxicidade, sendo necessária a utilização de outras abordagens ecotoxicológicas (BUSS et al., 2003). Neste caso, é preciso escolher um organismo sensor para ensaio, e para isso, é preciso seguir alguns critérios tais como: ampla distribuição geográfica, sensibilidade à diferentes contaminantes, importância ecológica, fácil cultivo e manutenção em laboratório, estabilidade genética etc. (ZAGATTO 2003). Tais estudos podem ser realizados em vários níveis de organização biológica, possibilitando a escolha em uma escala hierárquica (figura 2). Para tanto as respostas aos poluentes de efeitos agudos ou crônicos podem integrar desde os primeiros níveis de organização biológica, como citogenético, citológico, bioquímico, fisiológico até alterações no ecossistema. (MAGALHÃES 2008).

Figura 2 – Níveis de organização biológica



Fonte – Magalhães et al., (2008).

Dentre estas abordagens, os ensaios moleculares, assim como os citogenéticos, ganharam maior destaque pelo fato de ocorrerem mudanças nos conjuntos de genes devido a ação dos poluentes ambientais, bem como na capacidade destes ensaios detectarem danos causados por substâncias tais como pesticidas e metais pesados. Além disso, os biomarcadores moleculares são utilizados também para avaliar risco genético e câncer, incluindo o grau de risco entre populações humanas (JHA 2008 apud ALBERTINI 1996).

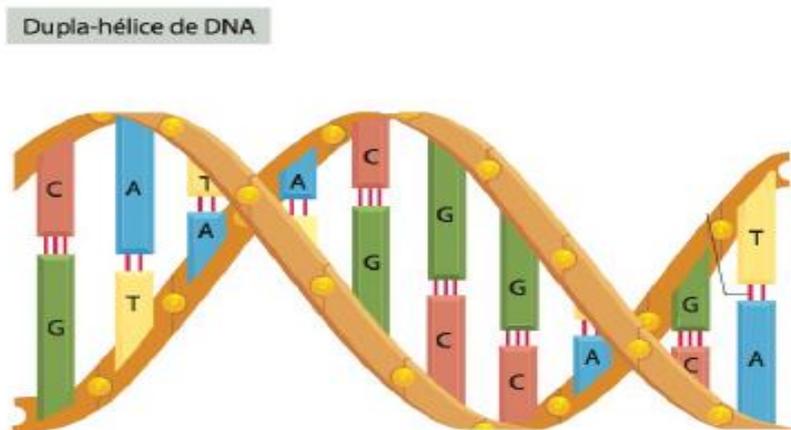
Os agentes capazes de causar danos genéticos, conhecidos como genotóxicos, são capazes de interagir com DNA e, alterar a sua estrutura, (CETESB 2014). Para a detecção dos danos nas células destaca-se a técnica *single-cell gel* conhecida como ensaio cometa. Tal ensaio é utilizado para identificar nas células a migração do DNA e sua aplicação tem sido crescente, pois comparado a outros ensaios genotóxicos este apresenta inúmeras vantagens tais como: ser sensível na detecção de danos e lesões, além do baixo custo (TICE 2000).

3.4 -Genotoxicidade

Muitas substâncias lançadas no ambiente, são consideradas genotóxicas, pois são capazes de mudar a estrutura do DNA, que por sua vez podem ser transmitidas para outras gerações, acarretando em desequilíbrio a biodiversidade. A genotoxicidade, estuda os processos que alteram a base da genética do DNA, considerada uma área nova, que norteia os campos a toxicologia, genética, genética toxicológica.

O DNA (Figura 3), é constituído de duas cadeias polinucleotídicas cujas subunidades monoméricas são os desoxirribonucleotídeos compostos por um grupamento fosfato, uma pentose do tipo desoxirribose e uma base nitrogenada. A união entre desoxirribonucleotídeos adjacentes em uma cadeia ocorre a partir da formação de uma ligação fosfodiéster onde há a liberação de pirofosfato inorgânico ($P_2O_6^{3-}$) e água. A estrutura tridimensional em dupla hélice é resultado de uma série de forças que garantem a estabilidade da molécula de DNA (ALBERTS et al., 2010).

Figura 3 – Estrutura do DNA



Fonte. Alberts, Bruce et al., (2010).

Os agentes mutagênicos, são capazes de alterar a sequência das bases do DNA, acarretando em um aumento de mutações. Como consequência podem aumentar os índices de doenças genéticas, câncer, entre outros, pois, apresentam a capacidade de integrar-se ao material genético ligando-se fortemente a molécula, interferindo no desempenho natural do DNA (SCHERER et al., 2013). Sendo assim, a mutagênese e carcinogênese são duas áreas que são fortemente ligadas, pois, a mutação refere-se à

sequência de dano no DNA e os carcinógenos as substâncias químicas capazes de induzir ao desenvolvimento de tumor. Para tanto, estudos na área de avaliação toxicológica humana e ambiental, tem ganhado destaque devido a indução do câncer, onde suas causas podem ser por vias endógenas ou exógenas, ou a combinação entre as vias. As fontes exógenas, estão relacionadas aos hábitos, costumes, cultura, e questões ambientais, já as fontes endógenas, são fatores estabelecidos geneticamente (RIBEIRO 2003). Entretanto, segundo Krokan (2000), as células que podem sofrer lesões também são capazes de manter a integridade e bom funcionamento por meio de sistemas de reparos. Em caso de falha no sistema de reparo pode acarretar em morte celular e apoptose, ou desequilíbrio das condições fisiopatológicas (JHA, 2008, ZENKNER et al., 2013)

Pesquisas na área da mutagênese tem sido crescente desde 1964 onde iniciou os estudos, se difundindo com vários grupos de pesquisadores inclusive no Brasil criado em 1989. A partir daí criou-se a necessidade de estudar cada vez mais os agentes químicos, aditivos de alimentos, diferentes fármacos antes de serem introduzidos no mercado, surgindo a área da genética toxicológica, considerada uma ciência que estuda efeitos do potencial genotóxico, indução de mutações, entre outros aspectos sobre as células de diferentes organismos. (RIBEIRO, 2003).

Inúmeros são os estudos os quais detectaram os efeitos de muitas substâncias causadoras de efeitos deletérios à saúde humana. LOEB et al., (2008) desenvolveram estudos no desenvolvimento de câncer, evidenciando-se que lesões celulares são realizadas a nível molecular, além de estudos de suscetibilidade a agentes cancerígenos ambientais específicos.

Estudos moleculares com animais têm sido realizados para diminuir impactos nos seres vivos e exposição humana aos agentes químicos. Testes realizados com coelhos frente a exposição ao alcatrão de carvão no Japão foi o primeiro estudo em relação a indução do câncer, uma vez que esta substância consiste de uma mistura complexa de substâncias químicas. O estudo confirmou o aumento da incidência de câncer escrotal em pessoas limpadoras de chaminés que mantinham contato prolongado com o alcatrão de carvão. Além de identificar os químicos carcinógenos em que os humanos são expostos, a utilização do modelo animal como mecanismo de estudo tem sido crescente, bem como as investigações da dose e resposta entre exposição de carcinógenos e a indução de câncer continua sendo um tema muito estudado na esfera científica e em debates públicos (LOEB et al., 2008).

No nosso país, o número de câncer malignos tem sido crescente. No sexo masculino as causas de neoplasias de pulmão está no topo de obitos em comparação a todos tipos de câncer, e no sexo feminino, as cinco primeiras neoplasias de maior frequência são: mama, colo do útero, cólon do reto, estomago, e pulmão. Tais fatos estão relacionados aos fatores ambientais tendo o fator genético como a causa secundária (FILHO et al., 2006).

As substâncias tóxicas podem ser de origem agrícola (ex. pesticidas os quais podem contaminar, água, ar e solo), fontes urbanas de contaminantes químicos, ou mesmo fontes de resíduos industriais. Muitos destes produtos químicos apresentam riscos no desenvolvimento de câncer, dependendo da ocupação humana no mercado de trabalho. Além dos prejuízos à saúde humana, estes compostos podem contaminar o ambiente, tais como; esgotos domésticos, lixos, metais, pesticidas, nutrientes em excesso (FONSECA et al., 2008). Segundo Filho et al., (2006), os fatores ambientais podem ser classificados de quatro formas: primeira - condições de vida (dieta, e tabagismo), segunda – ambiente de trabalho (exposição agentes químicos e radiações), terceira – ao ambiente (contaminação de solo, ar, água), quarta – intervenção terapêutica (medicação). Todos estes fatores podem lesionar as células. Entretanto, as células que sofrem agressões por exposição a estas substâncias, e podem não apresentar comprometimento nas suas atividades decorrentes da ação dos mecanismos de reparo empregados pelas células para corrigir possíveis danos e minimizar erros letais. Estes mecanismos são considerados normais e frequentes nos seres vivos, o que permite a sobrevivência a longo prazo, além disso, com mecanismo de reparo, são poucas as mutações acumuladas nas células, uma vez o equilíbrio da espécie está relacionado ao equilíbrio de reparo e mutação, pois as mutações em pequenas quantidades favorecem a variabilidade genética, e número excessivo pode comprometer a sobrevivência da espécie (SANDERS & BOWMAN 2014).

Segundo KROKAN et al., (2000) há uma série de mecanismos de reparo envolvidos com a correção de possíveis danos ocorridos durante o processo de replicação da molécula de DNA, dentre eles destacam-se:

- BER (*Base excision repair*) – Reparo de excisão das bases - remove as bases danificadas. O nucleotídeo é removido e um novo seguimento é ligado a cadeia pré-existente. Estes tipos de danos são considerados alterações de pequeno porte, simples, as quais não ocorrem distorções da hélice de DNA.

- NER (*Nucleotide excision repair*) - Reparo por excisão de nucleotídeos - remove nucleotídeos com dano. Neste caso as alterações de DNA distorcem a hélice (ex dímeros de pirimidina) os quais são reparados por excisão de nucleotídeos.
- MMR (*Mismatch repair*) - Reparo incompatível - corrige erros da replicação do DNA que resultam em pareamento errôneo de nucleotídeos seguindo com a replicação do DNA. Considerado a terceira principal via de reparo por excisão, pois envolve várias bases, além disso, este mecanismo tem maior atenção dos pesquisadores, pois, trata-se de genes defeituosos e são os responsáveis pelo desencadeamento de alguns tipos de câncer.

Sendo assim, a preocupação da exposição humana a inúmeros compostos tóxicos, favoreceu nos anos de 1960 o desenvolvimento de protocolos experimentais relacionados aos ensaios de mutagenicidade, com intuito de correlacionar a ação de compostos mutagênicos ao desenvolvimento de carcinomas. Dentro desta abordagem, foram introduzidos os ensaios de genotoxicidade como o do tipo cometa. Sua origem, portanto, vem da oncologia, dos ensaios com células de mamíferos *in vivo* ou *in vitro* visando elucidar efeitos negativos à saúde humana. Ademais, tais ensaios apresentam ainda inúmeras aplicações relacionadas a avaliação da contaminação de amostras de solo, ar ou água, bem como na avaliação de efeitos genotóxicos em amostras de águas brutas ou tratadas (ZAGATTO 2008). Pesquisadores e principalmente órgãos internacionais, reúnem esforços para que os testes genotóxicos sejam tomados como diretrizes regulatórias para padronização dos mesmos, e sendo assim, indicadores de carcinogenicidade (RIBEIRO 2003).

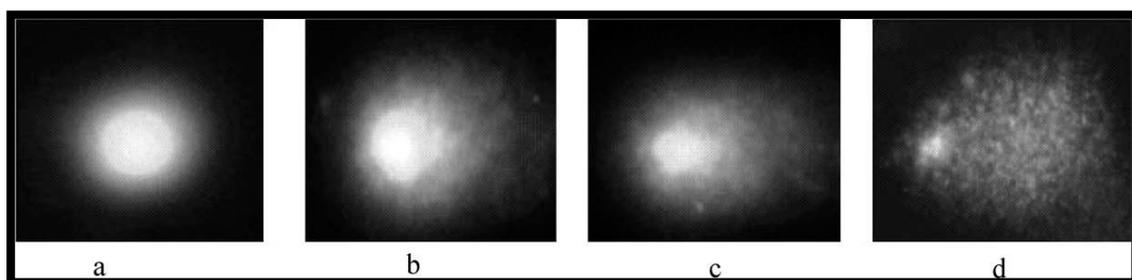
3.4.1- Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma técnica conhecida como corrida em eletroforese, chamada também como: “*Single cell gel*”. Consiste em quantificar danos no DNA em quaisquer células eucariotas, além disso, é também considerada uma técnica rápida e eficaz nos estudos de genotoxicidade (Singh et al., 1998)

Segundo Jha (2008), a técnica de eletroforese em célula única, conhecida popularmente como *ensaio cometa* é considerada uma ferramenta que revolucionou o campo da genética, devido a possibilidade de verificação de dano ao DNA, uma vez que as alterações podem ser permanentes e hereditárias. Porém, este ensaio não é utilizado para detectar mutações, e sim apenas lesões genômicas passíveis de reparo, podendo dessa forma fornecer informações importantes sobre o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (Albertini et al., 2000).

Esta técnica iniciou-se com os pesquisadores Ostling e Johanson em 1984 em que submeteram células sanguíneas de mamíferos misturadas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, imersas em solução de pH neutro à uma corrente eletroforética, na qual o DNA sofreu um processo de migração. Este processo permitiu a visualização de danos de quebras duplas no DNA. Posteriormente, Singh et al., (1988) aprimoraram esta técnica utilizando condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) e nesta nova versão, foi possível avaliar quebras de cadeia dupla e simples (DHAWAN et al., 2008; TICE, 2000; SINGH et al., 1988). A detecção destes danos é possível de se verificar em qualquer célula eucariota individualizada, em que os fragmentos de DNA gerados migram do núcleo para o meio extra nuclear, formando diversos tamanhos que, por sua vez, migrarão em velocidades diferentes formando uma figura típica de um “cometa/cauda”. De acordo com a extensão da cauda, é possível classificar manualmente os efeitos genotóxicos em classes que variam de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (Figura 4).

Figura 4 – Células do fígado de *Danio rerio* expostos com atrazina e vários tipos de dano. (A) Dano menor 1, dano, (B) Dano 2, (C) Dano 3, (D) Dano 4, maior dano.

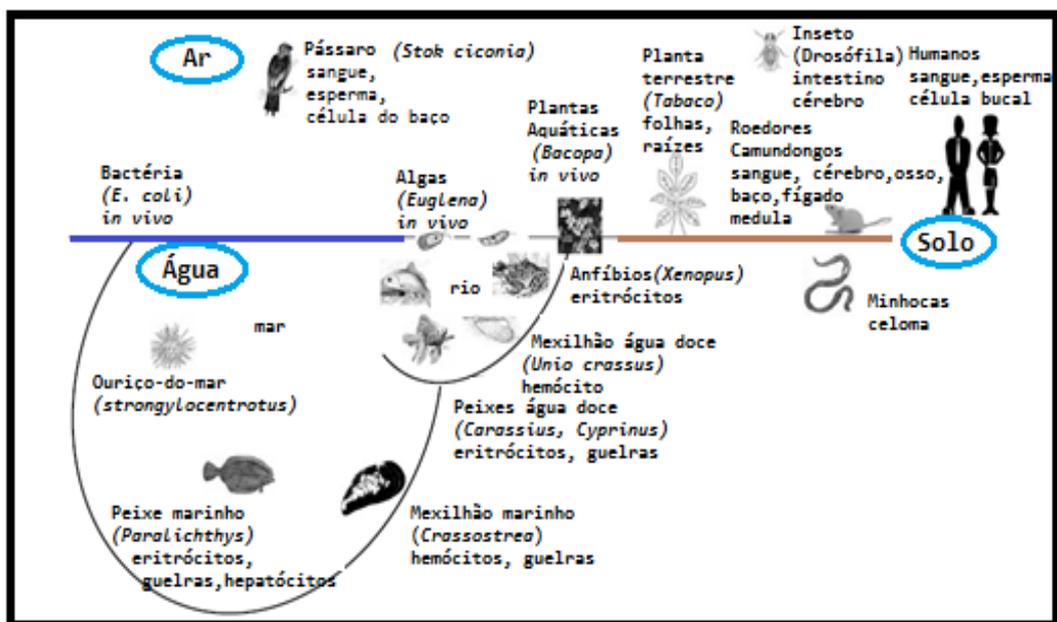


Fonte. ZHU et al. (2010).

A detecção destes danos genéticos que podem ser considerados danos alcalilábeis, ligações cruzadas, quebras de excisões de reparos que não foram concluídas (SINGH et al., 1988).

Desde sua criação, este ensaio tem sido aprimorado. Atualmente consiste em uma ferramenta bem estabelecida, além de ser considerada simples e versátil, pois, em curto período de tempo é possível obter resultados, além da vantagem de requerer um número pequeno de células para verificação de dano ao DNA (DHAWAN et al., 2008). Sua aplicação ganhou ampla aceitação, uma vez que pode ser realizado com células de diferentes organismos desde bactéria até organismos de grande relevância na cadeia trófica (Figura 5).

Figura 5 – Diagrama da aplicação do ensaio cometa em diferentes organismos



Fonte. DHAEWAN et al. (2008).

ABD-ALLAH et al., (1999) acrescentam que o ensaio cometa tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de várias espécies de peixes, devido à sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos. Em peixes coletados em locais contaminados com uma variedade de compostos tais como: pesticidas, metais pesados, PCBs organoclorados, essa técnica também tem sido aplicada com outros tipos de células, tais como hepatócitos, células das branquiais, renais e intestinais (Otter et al., 2012). Como por exemplo, estudos realizados por Figueroa, (2013), cujo objetivo foi analisar

dano ao DNA em células branquiais de *Danio rerio* expostos a surfactantes, observou-se o teor genotóxico destes diferentes detergentes os quais contêm substâncias tensoativas. Para avaliação da qualidade da água do Rio Pardinho, Zenkner et al., (2013), foram realizadas coletas do material biológico *in situ* da espécie *Astyanaz fasciatus*. As amostras de sangue realizada por punção cardíaca foram armazenados para posterior processamento do teste cometa. Neste estudo, foi possível detectar índices de dano na região em direção a foz do rio. Entretanto, este aumento não segue de forma linear, caracterizando impactos por diferentes cargas tóxicas causadoras de dano ao DNA.

ZHU et al., (2010), observaram indícios de genotoxicidade através do ensaio cometa, em células do hepatopâncreas de *Danio rerio*, expostos as diferentes concentrações de atrazina (0.0 a 1.0mg L⁻¹) por 5, 10, 15, 20 e 25 dias de exposição. Trata-se de uma substância muito frequente em herbicidas, além de apresentar capacidade de persistência no ambiente.

Além da identificação manual realizada com auxílio de um microscópio, os danos também podem ser avaliados por ferramentas computacionais, tais como o CASP, um programa de domínio público, utilizado em qualquer cor em escala de cinza. No entanto, para os ensaios corados com nitrato de prata as imagens devem ser convertidas em imagem negativa (KONCA et al., 2003). Entre outros programas, o OpenComent, é uma ferramenta automatizada e robusta que permite usar imagens capturadas diretamente do microscópio para calcular o tamanho da cauda, ou seja o DNA migrante (GYORI, 2014).

3.5. Organismo teste: *Danio rerio*

O peixe *Danio rerio* (Figura 6) foi o organismo selecionado para avaliação ecotoxicológica no presente projeto por ser tratar de um organismo padrão de uso nos ensaios ecotoxicológicos, além de ocupar importante posição na cadeia alimentar. (ABNT/NBR 15088/2011). Esta espécie pertence à família Cyprinidae e foi descrita por Francis H. Buchanan em 1822 quando observada no rio Ganges (OLIVEIRA, 2009).

Dentre as características marcantes desta espécie, destacam-se listras longitudinais quando adultos. Apresentam barbatanas pélvicas emparelhadas e os ovos são transparentes e sofrem alterações até a fase larval (GUPTA e MULINS, 2010). Os

machos são alongados com corpo levemente dourado, mais visível na região abdominal e nadadeiras peitorais com listras horizontais em todo corpo. As fêmeas são mais robustas, com abdome maior devido abrigo de ovos, além disso as listras são incompletas e diferentemente do macho seu corpo predomina a coloração prateada (ZAGATTO 2008).

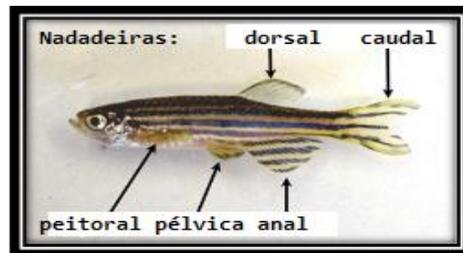


Figura 6 – Exemplar de *Danio rerio*.
Fonte. Gupta & Mulins (2010).

A espécie apresenta inúmeras vantagens para aplicações nos ensaios ecotoxicológicos, tais como a fácil manutenção em laboratório, vivem em locais com variações de temperatura de 24 a 38°C, apresenta um ciclo de vida curto, e atinge a maturidade sexual em poucos meses (75 dias aproximadamente), quando atingem comprimento padrão de 25mm para fêmeas e 23 mm para machos. Esta espécie é ovípara, com a postura de 300 ovos, sendo 70% viáveis para teste. Além disso, o peixe-zebra como vulgarmente é conhecido, apresenta similaridade celular nos processos fisiológicos, com vertebrados superiores (OLIVEIRA, 2009).

A espécie tornou-se um organismo modelo para compreensão de doenças em inúmeros estudos Gupta & Mulins (2010). Para efeitos genotóxicos a espécie tem grande destaque desde anos 30, entre suas vantagens encontra-se a capacidade de adaptação a ambientes naturais e artificiais. Tais características fizeram com que este organismo fosse bastante utilizado em pesquisas científicas (MAGALHÃES, 2007). No entanto, este organismo também tem sido utilizado em diversas pesquisas com diferentes objetivos, dentre os quais os de identificação dos genes.

Neste sentido, tem se ampliado o conhecimento acerca das importantes funções dos genes, tais como: estudos em relação ao fenótipo e a perda de função, das suas estruturas e metabólicos bioquímicos das proteínas, e distribuição de produtos dentro do gene. Pesquisadores encontram dificuldades para realização destes estudos com outros vertebrados, devido a variação de geração, manutenção e criação em laboratório. Sendo assim o *Danio rerio*, apresenta muitas vantagens como a fácil manipulação dos embriões

e sua cor translúcida facilita a observação ao microscópio, permitindo a compreensão de um grande número de características fenotípicas. Além disso, os ovos podem ser fertilizados *in vitro*, e o esperma congelado. Todas estas características permitem que os estudos de mutações possam ser realizados com eficiência uma vez que os organismos podem ser expostos em diferentes fases do ciclo de vida (HAFFTER et al., 1996).

Estudos referentes a mutações mitocondrial (mtDNA) também tem sido realizado com *Danio rerio*, uma vez que este tipo de mutação tem uma série de efeitos prejudiciais. Nos humanos foi possível identificar por meio dos estudos mtDNA, doenças degenerativas, envelhecimento, patologias ocorridas devido à perda de ATP (fornecidas pelas mitocôndrias), e processos de morte célula. *Danio rerio*, tem sido um excelente modelo, proporcionando uma base científica importante para estudos de desenvolvimento de doenças em função do desequilíbrio mitocondrial (BROUGHTON, et al., 2001).

Danio rerio, também é utilizado em pesquisas em hospitais para elucidar efeitos à saúde humana, perante suas reações metabólicas a exposição de fármacos. O centro de pesquisa do hospital de Porto Alegre, utiliza o organismo para estudos na área de Hepatologia, com intuito de compreender mutações genicas, ou erros no desenvolvimento embrionário. Tais investigações abrem leque de oportunidades da aplicação do organismo como modelo experimental em diferentes investigações (SCHNEIDER et al., 2009).

Além da utilização de organismos adultos, e juvenis, testes com embriões de *Danio rerio*, tem sido crescente, e tem se analisado a eficiência da utilização dos embriões em testes de efeitos agudos pois, é sabido que para estes testes, são utilizados organismos jovens e adultos, porém, há uma preocupação ética devido ao sofrimento dos organismos, ou devido a exposição de um composto químico/agressor nas diferentes concentrações. Dentre as vantagens, o uso do embrião nos testes é realizado dentro das 48 horas de desenvolvimento, (justificando a questão ética por se tratar de um organismo não completo), além da eficácia nos resultados, o *Danio rerio*, tem sido o maior precursor em pesquisas para esclarecer inúmeros efeitos de xenobióticos aos vertebrados (NAGEL, RONALD 2002).

4. Materiais e Métodos

4.1 - Campo: coleta das amostras de água e caracterização das variáveis físicas e químicas

As coletas das amostras de água foram realizadas na micro bacia do Ribeirão José Pereira/Itajubá nos meses de agosto e outubro de 2014, considerados normalmente como períodos seco e início do período chuvoso respectivamente, mas que devido ao longo período de estiagem no ano de 2014 o mesmo poder-se classificar como período seco. As amostras de água coletada foram superficiais, por se tratar de um afluente de baixa vazão, com previa ambientação de todos os frascos.

O mapa de drenagem da micro bacia com os respectivos pontos amostrais estão ilustrados na Figura 1 e suas coordenadas geográficas na Tabela 1. A Figura 7 ilustra os quatro pontos de amostragem.



Figura 7 - Pontos de coleta: (P1), ponto 1, (P2), ponto 2, (P3) ponto 3, (P4) ponto 4 – Micro bacia do Ribeirão José Pereira/ Itajubá/Minas Gerais (2014).

Fonte. A autora (2015).

Tabela 1 – Localização dos pontos amostrais na micro bacia do Ribeirão José Pereira/ Itajubá/Minas Gerais.

Estação	Coordenadas geográficas	Descrição
P1	<u>45° 22.61690' O</u> 22° 25.52580' S	Área considerado o ponto controle, captação pela COPASA, para abastecimento público
P2	<u>45° 23.93938' O</u> 22° 25.38766' S	Área próximo a área de pastagem e pequenas agriculturas familiares.
P3	<u>45° 25.46653' O</u> 22° 24.69863' S	Área de confluência com outros afluentes (agricultura).
P4	<u>45° 27.32715' O</u> 22° 25.53155' S	Área próximo a foz, zona urbana do ribeirão José Pereira.

In loco foram quantificadas as variáveis: pH, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e condutividade ($\mu\text{s/cm}^{-1}$), com auxílio de uma sonda multiparâmetro marca *HANNA*.

Em cada ponto de amostragem, mediante os devidos frascos etiquetados e ambientados, foram coletadas amostras de água superficial para posterior quantificação em Laboratório das seguintes variáveis: Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO, Demanda Química de Oxigênio-DQO, Clorofila *a* Fósforo dissolvido, Fósforo total, Amônia, Nitrogênio total, Nitrito, Sólidos totais, Carbono total, e Metais. Tais amostras foram acondicionadas em caixas de isopor, com ausência de luz, e ao chegarem no laboratório algumas foram imediatamente processadas, tais como DBO e DQO, e as demais, mantidas sobre refrigeração ou freezer, dependendo da variável.

Para análise dos metais (apenas qualitativo) as amostras de água foram fixadas com ácido nítrico 10%, e para quantificação de fósforo total com ácido clorídrico 10%.

Quanto a quantificação das bactérias do grupo coliformes totais, as amostras de água foram acondicionadas em frascos previamente esterilizados em autoclave e mantidos em isopor a 4°C . Esta variável foi determinada imediatamente ao retornar do campo, no Laboratório de Microbiologia da UNIFEI, assim como a filtração das amostras

de água para determinação do teor de clorofila *a*. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Análises Físicas e Químicas da UNIFEI.

Em cada ponto de amostragem foram coletados 60 litros de água para uso nos ensaios de genotoxicidade/ensaio cometa. Nestes ensaios os exemplares de *Danio rerio*, foram expostos por até 10 dias, considerado então uma exposição crônica. Tais amostras foram acondicionadas em galões de 20 litros, mantidos em câmara refrigerada a 4^oC.

4.2. Laboratório: Aclimação dos exemplares de *Danio rerio*

Os exemplares de *Danio rerio* adquiridos de tanques de piscicultura de boa procedência para ambas as datas amostrais, foram encaminhados para o Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei e aclimatados por duas semanas com água livre de contaminação (fonte natural da comunidade sol de Deus/ Itajubá/ MG). Decorrido este período foi coletado cerca de 10% do lote para verificação da homogeneidade da amostra, aferindo o peso médio e tamanho. Tais organismos foram descartados para uso nos ensaios de exposição, uma vez que esta manipulação pode causar estresse aos mesmos e interferir nos resultados dos ensaios (falso positivo). Como resultado obteve a massa média de 0,35 gramas com 4,0 cm de tamanho, o que caracteriza peixes adultos. Com base neste valor foi respeitado o mínimo de 1 grama de peixe por litro de amostra de água para distribuição da densidade populacional nos aquários (tratamentos) conforme ABNT/NBR 15088/2011.

4.3 Exposição de *Danio rerio* às amostras de água

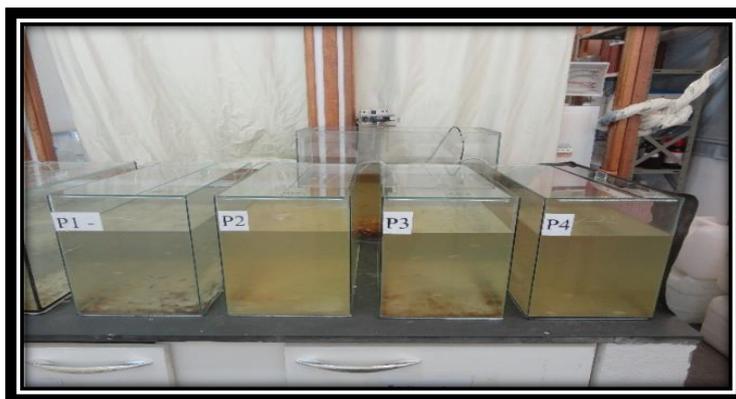
Decorrido o período de aclimação, iniciaram-se os ensaios de exposição dos organismos por 10 dias às amostras de água provenientes dos quatro locais de amostragem. Foram distribuídos 21 exemplares de *Danio rerio* para cada tratamento/ponto amostral em cada aquário, (Figura 8), sob constante aeração. Os aquários foram mantidos em sala com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}$ C, fotoperíodo de 12 horas/claro-escuro, com constante aeração, alimentados com uma porção diária de ração floculada Tetramin, exceto os organismos coletados em dia de experimento.

Durante os 10 dias de exposição foram realizadas duas trocas de água (correspondentes aos períodos de 72h, e 168 horas), sendo para cada, foi realizada a

retirada de um terço do total de água do aquário (20 litros), (Figura 9). Nestas etapas também foram realizadas a limpeza dos restos de ração no fundo do aquário.

Todo este procedimento foi realizado nas duas épocas amostrais – Agosto e Outubro de 2014.

Figura 8 – Exposição *Danio rerio* com amostras de água de diferentes pontos de coleta da micro bacia do Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG.



Fonte. Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei - Fonte: a autora (2014).

Figura 9 – Alimentação de exemplares de *Danio rerio* e troca de água dos tratamentos/aquários provenientes da micro bacia do Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG.



Fonte. Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei - Fonte: a autora (2014).

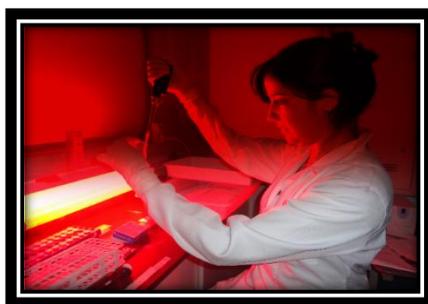
4.4 Ensaio de Genotoxicidade: cometa

Os tempos de exposição para execução do ensaio cometa com células branquiais foram de 48, 72 horas e 10 dias com o uso de 7 exemplares de *Danio rerio* em cada tempo.

Para tanto, foi realizado a decapitação dos organismos, previamente anestesiados com gelo. Para tal procedimento os exemplares foram transferidos para um béquer com água do respectivo ponto amostral/aquário e imerso em uma base com cubos de gelo (0-4°C), por cerca de 10 minutos. Após notar a perda do equilíbrio e diminuição do movimento opercular (considerado anestesia profunda) foi realizado o procedimento experimental conforme Asprea (2013), Orieux (2011), e *Guidelines* para pesquisa com *Danio rerio*, disponível em: (<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Zebrafish.pdf>). A metodologia do ensaio cometa adotada no presente trabalho foi a descrita por Lemos et al., (2005), Da Silva et al., (2007), Figueroa (2013). Para tanto, foram coletadas as guelras de cada indivíduo e após maceradas com auxílio de pinça de aço inoxidável e lâminas de bisturi, sob um vidro de relógio, acrescidas de 5 gotas de PBS. Deste macerado, foram coletados 5 µl da suspensão celular diluída com 95 µl de agarose – com baixo ponto de fusão (LMP) em réplica (lâminas A e B) para cada animal. Todo este material foi distribuído em lâminas, previamente pré-cobertas com agarose 1,5% (w/v) e posteriormente com lamínulas. Após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em cubas histológicas contendo solução de lise gelada (2,5M L⁻¹ NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10.0-10.5) contendo 1% Triton X-100 e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Todo este material foi protegido da luz (cuba recoberta com papel alumínio) e, mantido em geladeira por no mínimo duas e no máximo de 72 horas.

Posteriormente, as lâminas foram distribuídas em cuba de eletroforese imersas em solução tampão alcalino recém-preparado (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH 13.0) por 20 minutos para a desnaturação do DNA. Em seguida, todas as lâminas confeccionadas foram submetidas a uma corrente elétrica a 300 mA e 25V. por 20 mim. Todas estas etapas foram realizadas sob luz vermelha indireta para preservação das amostras (Figura 10).

Figura 10 – Realização do ensaio cometa - luz vermelha indireta. Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei.



Fonte. Laboratório de Ecotoxicologia da Unifei – Fonte: a autora (2014).

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução de 0,4 M Tris (pH 7,5), lavadas três vezes em água destilada, e secas em temperatura ambiente. As lâminas secas foram fixadas com solução de ácido tricloacético 15% w/v, sulfato de zinco 5% w/v, glicerol 5% v/v por 10 min, lavadas três vezes em água destilada e secas à temperatura ambiente. Na etapa seguinte, as lâminas secas foram re-hidratadas por 5 minutos em água destilada e posteriormente coradas (solução de carbonato de sódio 5% w/v, nitrato de amônia 0,1% w/v, nitrato de prata 0,1% w/v, ácido tungstosilicico 0,25%, formaldeído 0,15% w/v, preparados no escuro) e constantemente agitadas por 10 minutos, deixando-as na solução o tempo suficiente para corar.

As lâminas coradas foram lavadas duas vezes com água destilada e submergidas na solução de parada (ácido acético 1%), lavadas novamente e imediatamente codificadas para análise. As contagens do Índice de danos (ID) e Frequência de danos (FD) foram realizadas utilizando microscópio óptico.

Para o cálculo do índice de dano (ID), 100 células de cada repetição (lâminas A e B) foram escolhidas aleatoriamente (50 em cada lâmina). O (ID) é a soma das classes de 100 células analisadas, e pode variar de 0 (todas as células sem danos – 0x100) até 400 (todas as células com danos – 4x100). Tal procedimento é baseado no comprimento da migração e da quantidade de DNA na cauda, e é considerada uma medida sensível de danos detectáveis ao DNA (Equação 1). A frequência de danos (FD) foi calculada pelo número de células com cauda, independente da classe de dano, em relação ao número de células sem cauda (Equação 2).

Equação 1:

$$ID_{total} = 0 (n_{Classe 0}) + 1(n_{Classe 1}) + 2(n_{Classe 2}) + 3 (n_{Classe 3}) + 4 (n_{Classe 4})$$

Equação 2:

$$FD (\%) = [(n_{total} - n_{Classe 0}) / n_{total}]$$

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI, após um treinamento oferecido pela doutoranda Emilene Arusiewicz da UFABC – Universidade Federal ABC, sob orientação da Profa. Ana Lúcia Fonseca. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa no uso de Animais da Faculdade de Medicina de Itajubá (CEUA-FMI), sob número de protocolo 010/14.

4.5- Variáveis Químicas e Biológicas

As metodologias utilizadas para quantificação das variáveis químicas, microbiológicas e hidrológicas encontram-se na Tabela 2. Tais quantificações foram realizadas nos Laboratórios de Análises Físicas e Químicas, Microbiologia e Materiais da UNIFEI.

Tabela 2 – Metodologias utilizadas nas quantificações das variáveis químicas, microbiológicas e metais com amostras de água provenientes da micro bacia do ribeirão José Pereira/Itajubá/MG.

Variável	Metodologia
DBO	<i>APHA-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22ed, 2012.</i>
DQO	<i>APHA-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22ed, 2012.</i>
Nitrogênio Total	Valderrama, 1981
Nitrito	Golterman et al, 1978
Fósforo Dissolvido	STRICKLAND & PARSONS (1960)
Fósforo Total	VALDERRAMA (1981)
Amônia	KOROLEFF (1976)
Sólidos Totais	Teixeira et, al (1965); Tundisi,1969, com modificações
Coliformes totais e fecais	Método do Colilert - <i>APHA-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22 ed, 2012.</i>
Carbono total	<i>APHA-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22 ed, 2012.</i>
Clorofila a	Mackiney, G. 1941
Metais- qualitativo	Espectroscopia de energia Raio X dispersivo/EDS acoplado a Microscopia eletrônica de varredura – MEV.

4.6 – Índice de Estado Trófico/IET – Rios

A metodologia para determinação do Índice de Estado Trófico foi de acordo com Lamparelli, (2004).

4.7. Análise estatística

Os resultados do ensaio cometa, foram expressos em média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os quatro locais de amostragem foram determinadas por uma análise de variância (teste ANOVA, Dunnet's de comparação entre as médias) e, e Tukey, realizadas por meio do programa (GraphPad Prism versão 6.0) de 2015 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

5.0 Resultados e Discussão

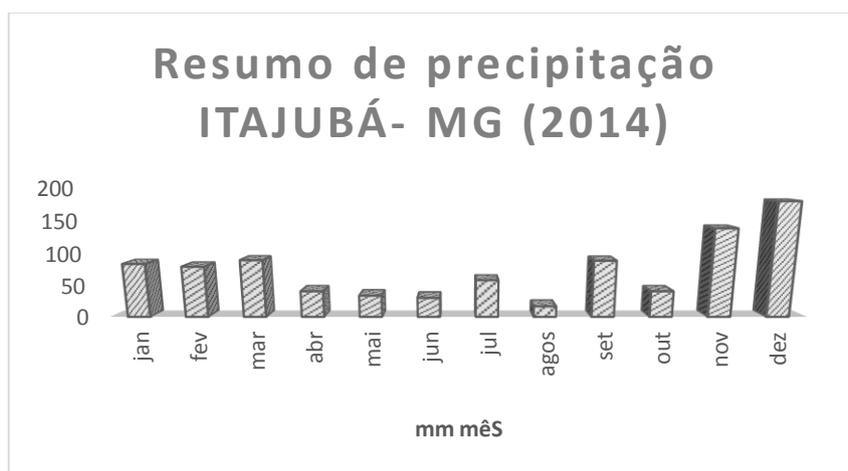
5.1 – Variáveis Físicas e Químicas: *in situ*

As coletas das amostras de água como já mencionadas, foram realizadas em duas campanhas, sendo a primeira em agosto/14 caracterizado por período de estiagem, e para comparação sazonal foi realizado a segunda campanha em outubro/14, época em que foi marcada por uma gradual precipitação na região sudeste.

De acordo com os dados coletados pela estação climatológica na UNIFEI (Figura 11), é possível analisar o comportamento dos volumes de precipitação ao longo do ano de 2014. A primeira campanha realizada em agosto, caracteriza o mês de maior índice de estiagem, com valor de 16,8 mm de precipitação. Em setembro iniciou o período de maior precipitação, com valores registrado de 88,6 mm, e em outubro, época da segunda campanha, os níveis de precipitação foram de 40,6 mm, valor este abaixo comparado ao mês de setembro, mais ainda superior as de agosto de 2014. No entanto, comparando com valores dos anos anteriores, os quais caracterizam fortemente como períodos de seca e chuva, no ano de 2014 foi evidenciado uma escassez hídrica, ficando a média de chuvas bem abaixo da média histórica no sul e sudeste do Brasil, de acordo com Instituto

Nacional de Meteorologia – INMET (2014). Tal ano foi caracterizado por um período de anomalias nos volumes das precipitações em todo Brasil. Mediante tais observações, os resultados obtidos entre os períodos amostrais no presente trabalho serão apresentados de maneira comparativa entre as duas campanhas.

Figura 11 - Volume total de precipitação (mm) no ano de 2014 na cidade de Itajubá/MG.



Fonte. CEPRENG – UNIFEI (2014).

Os resultados das variáveis físicas e químicas obtidas *in situ*” com auxílio da sonda multiparâmetro *Hanna* estão descritos Tabela-3. É possível observar um declínio na concentração de oxigênio dissolvido nas duas campanhas de estudo no ponto correspondente à área urbana (P4). Tal resultado pode caracterizar influência antrópica, sendo mais acentuada no mês de agosto (época de estiagem), porém apresentou nível próximo ao permitido pelo CONAMA 357/05 para rios de Classe 2, cujo valor não pode ser inferior a 5,0 mg/L.

Os valores de pH (potencial hidrogênionico) encontram-se dentro das normas estabelecidas pela legislação vigente (CONAMA 357/05 para rios de Classe 2), com algumas variações ao longo do curso da micro bacia, e com comportamento mais alcalino para as amostras de água coletadas no mês de Outubro/2014.

Os valores de condutividade refletem as ações antrópicas ocorridas nesta micro bacia, com aumento gradativo dos pontos (P1) ao (P4) nas duas campanhas. Observa-se que os maiores valores foram obtidos no ponto 4 (área urbana). Tais resultados corroboram com

os valores de sólidos totais dissolvidos, em que o maior valor foi de 109 mg.L⁻¹ no mês de outubro, como consequência do início do período das chuvas.

Quanto aos valores de temperatura, os menores valores, porém não muito diferentes entre os pontos, foram obtidos no ponto controle (P1), local este rodeado por vegetação, o que contribui para manutenção desta variável.

Apenas com estes resultados, é possível confirmar as alterações antrópicas nesta micro bacia. Tais alterações são bem perceptíveis na área mais urbanizada (Ponto 4), com aumento nos valores de temperatura, condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos e declínio de pH em ambas campanhas.

Tabela - 3 – Valores das variáveis físicas e químicas obtidas *in situ* com auxílio da sonda Multiparâmetro HANNA em amostras de água nos quatro pontos amostrais na micro bacia do Ribeirão José Pereira/Itajubá/MG, nos meses de Agosto e Outubro de 2014.

	1º Campanha				2º Campanha			
Período	Agosto				Outubro			
Pontos	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Oxigênio Dissolvido (mg/L ⁻¹)	7,4	7,2	7,5	5,4	7,6	6,9	7,0	6,4
pH	7,0	7,3	8,7	7,3	8,1	8,1	8,2	7,9
Temperatura (T°C)	12,2	14,6	16,6	16,5	14,8	16,9	19	22,8
Condutividade (µs/cm ⁻¹)	14	35	47	80	6	29	44	75
Totais sólidos dissolvidos (mg/L ⁻¹)	4	18	24	40	6	26	43	109

5.2 - Variáveis Físicas e Químicas: Laboratório

Os valores das variáveis físicas e químicas obtidas com as amostras de água dos quatro pontos de amostragem em ambas as campanhas, contribuíram para uma melhor interpretação da interferência antrópica na micro bacia (Tabela 4), como por exemplo os maiores valores de coliformes totais encontrados no ponto P4 (zona urbana). É possível

observar um aumento gradativo nos valores de fósforo total do (P1) ao (P4) nas duas campanhas, em que ambos estão acima dos valores recomendados pelo CONAMA 357/05. Segundo CETESB 2009, as principais fontes de fósforo total na água estão relacionadas aos despejos sanitários, matéria orgânica fecal, fertilizantes e pesticidas. Tais influências antrópicas podem ser as fontes responsáveis pelos valores de fósforo total encontrados nas amostras de água em todos os pontos amostrais abordados no presente estudo.

No entanto, ao se calcular o Índice de Estado Trófico – IET para rios conforme Lamparelli, 2004, com apenas os valores de fósforo total, todo o trecho avaliado foi considerado como ultraoligotrófico (valores de ≤ 47) (Tabela 5).

Para Agência Nacional das Águas (ANA - 2015), quando ocorre o nível ultraoligotrófico nos rios, não há prejuízos quanto ao uso da água, pois os nutrientes são tão baixos que se tornam irrelevantes. Em relação a bacia do Rio Grande/MG, onde a micro bacia do José Pereira está inserida, de 2012 a 2013 o índice de estado trófico se concentra a maior porcentagem em mesotrófico, seguindo com oligotrófico e ultraoligotrófico (IGAM – 2013).

As demais variáveis quantificadas – DBO, DQO, clorofila *a*, nitrito, amônia, nitrogênio total e sólidos dissolvidos totais - (Tabela 4), as quais possuem limites máximo permitido para rios de Classe 2, apresentaram valores inferiores aos estabelecidos pelo CONAMA 357/2005. Tais resultados permitem configurar o ribeirão José Pereira como rio Classe 2.

Embora os valores obtidos no presente trabalho estejam dentro das normas estabelecidas para CONAMA 357/2005 classe 2, o nitrito é um elemento extremamente tóxico para os peixes, pois em condições elevadas ocorre a oxidação do átomo de ferro contido na hemoglobina do sangue destes animais, que por sua vez impede o transporte de oxigênio. A concentração de 7,0 mg.L⁻¹ de nitrito é considerada um grande risco para a espécie de peixe, *Cichlasoma facetum* (Cichlidae) (PIETRAS et al., 2006).

O maior valor de sólidos totais dissolvidos foi detectado no Ponto 2 (área de agricultura) na campanha de agosto de 2014, uma vez que os dados desta variável na segunda campanha não foram coerentes. Tal variável em excesso pode acarretar danos a biota aquática tanto bentônica, como planctônica bem como interferir no habitat para

desovas de peixes, além da penetração de luz e conseqüentemente na atividade fotossintética (PIRATOBA 2013).

Os índices de clorofila *a* na área estudada é bem inferior ao permitido para águas de abastecimento classe II (CONAMA 357/05), apresentando níveis muito baixos em todos pontos amostrais nas duas campanhas, o que é de se esperar por se tratar de um ambiente lótico.

Podemos dizer que em quase todos os compostos orgânicos sintéticos lançados na natureza apresentam em sua composição o elemento carbono. Neste grupo inclui os produtos químicos, pesticidas, resíduos de esgotos que permanecem no ecossistema devido sua característica apolar, além disso o carbono influencia na concentração de oxigênio dissolvido (PARRON 2011). Podemos notar que há um aumento gradativo da concentração de carbono orgânico total (campanha 1) observado do montante à jusante (pontos 1 ao 4). Cabe ressaltar que na área apresentada como controle, Ponto 1, tal variável deve ser monitorada, pois este elemento serve como fonte de energia para bactérias e algas e desta forma este elemento é utilizado como indicador de poluição (CESTEB 2015), uma vez que esta água é utilizada para abastecimento público da cidade de Itajubá/MG. A adição de compostos clorados na mesma, poderá aumentar a concentração dos subprodutos da cloração, os trihalometanos, os quais podem estar em concentrações acima dos níveis permitidos para água potável (Portaria MS/2914/2011).

No ecossistema aquático, o nitrogênio apresenta um grande papel no metabolismo do ecossistema, sendo a substância fundamental para formação de proteínas. Trata-se do elemento básico na síntese de biomassa, conseqüentemente se disponível em baixas concentrações haverá baixa produção primária (ESTEVES 2011) e em excesso podem ser prejudiciais, que aliada a concentração de fósforo contribuem para o processo de eutrofização (CETESB 2009).

Evidencia-se que os valores de nitrogênio total obtidos no trecho estudado da micro bacia do Ribeirão José Pereira (Tabela 4), estão no limite para ser classificados como rios de Classe 2.

No período de seca os dados referentes aos coliformes totais, foram mais expressivos na primeira campanha, além disso evidencia claramente um aumento gradativo dos pontos (P1) ao (P4), o que confirma uma maior contribuição da área urbana.

Tabela 4 – Valores das variáveis físicas, químicas e biológicas, obtidas com as amostras de água coletadas na micro bacia do ribeirão José Pereira nos meses de agosto (primeira campanha) e em outubro (segunda campanha) em 2014.

Variáveis Físicas, químicas e biológicas	1º CAMPANHA				2º CAMPANHA				VP CONAMA (357/05) Classe 2
	Agosto				Outubro				
PONTOS	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	
DBO mg/L ⁻¹	1	2	1	1	1	2	2	1	≤ 5,00
DQO mg/L ⁻¹	5,9	6,6	4,4	7,0	5,3	5,9	5,9	5,3	≥ 5,00
Clorofila a µg/L ⁻¹	0	0,02	0	0,02	0,004	0,01	0,004	0,009	≤ 30,00
Fósforo diss. mg/L ⁻¹	37,9	84,4	23,2	158,9	12,8	23,9	23,9	102,3	-
Fósforo total µg/L ⁻¹	0,88	0,91	0,92	0,93	0,85	0,89	0,87	0,98	0,1
Amônia mg/L ⁻¹	0,001	0,02	0,005	0,02	0,005	0,08	0,005	0,02	3,7 p/ pH ≤ 7,5 2,0 p/ pH 7,5 < pH ≤ 8,0 1,0 p/ pH 8,0 < pH ≤ 8,5 5,0 pH > 8,5
Nitrito mg/L ⁻¹	0,03	0,1	0,09	0,91	0,02	0,12	0,07	0,35	≤ 1
Sólidos totais mg/L ⁻¹	155	497	156	275					≤ 500
Carbono total mg/L ⁻¹	8,2	10,4	11,4	20,5	9,5	4,2	3,8	9,1	-
Nitrogênio total mg/L ⁻¹	1,9	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	2,0	≤ 2,0
Coliformes. Total - NMP/(1:100ml)	426	723	1296	6867	5	70	261	344	-

VP: Valor permitido para ambiente lótico (Resolução CONAMA 357/2005 estabelecido para águas classe II).

Tabela 5 – Valores do Índice de Estado Trófico/ Fósforo Total - (IET), obtidas com as amostras de água coletadas na micro bacia do ribeirão José Pereira nos meses de agosto (primeira campanha) e em outubro (segunda campanha) em 2014.

IET ($Pt\ \mu g.L^{-1}$)	1º CAMPANHA				2º CAMPANHA			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
	35	35	35	35	35	35	35	36

A análise qualitativa dos metais por microscopia eletrônica de varredura, acoplada ao sistema de energia dispersiva (EDS), foi realizada apenas com as amostras de água coletadas em agosto (período de estiagem) nos quatro pontos amostrais. É possível observar uma maior concentração de sólidos nos pontos (P2)/ B – agricultura e pastagem, e (P4)/D área urbana (Figura 12), bem como a presença dos respectivos metais em todos os pontos avaliados de forma pontual nas amostras destes filtros (Figura 13).

Figura 12 –Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) - Das amostras de água coletada nos pontos amostrais A – (P1) – ponto controle, B – (P2) – Agricultura/pasto, C – (P3) – Confluências de áreas adjacentes, D (P4) – Área urbana – micro bacia do José Pereira-MG, no mês de agosto 2014.

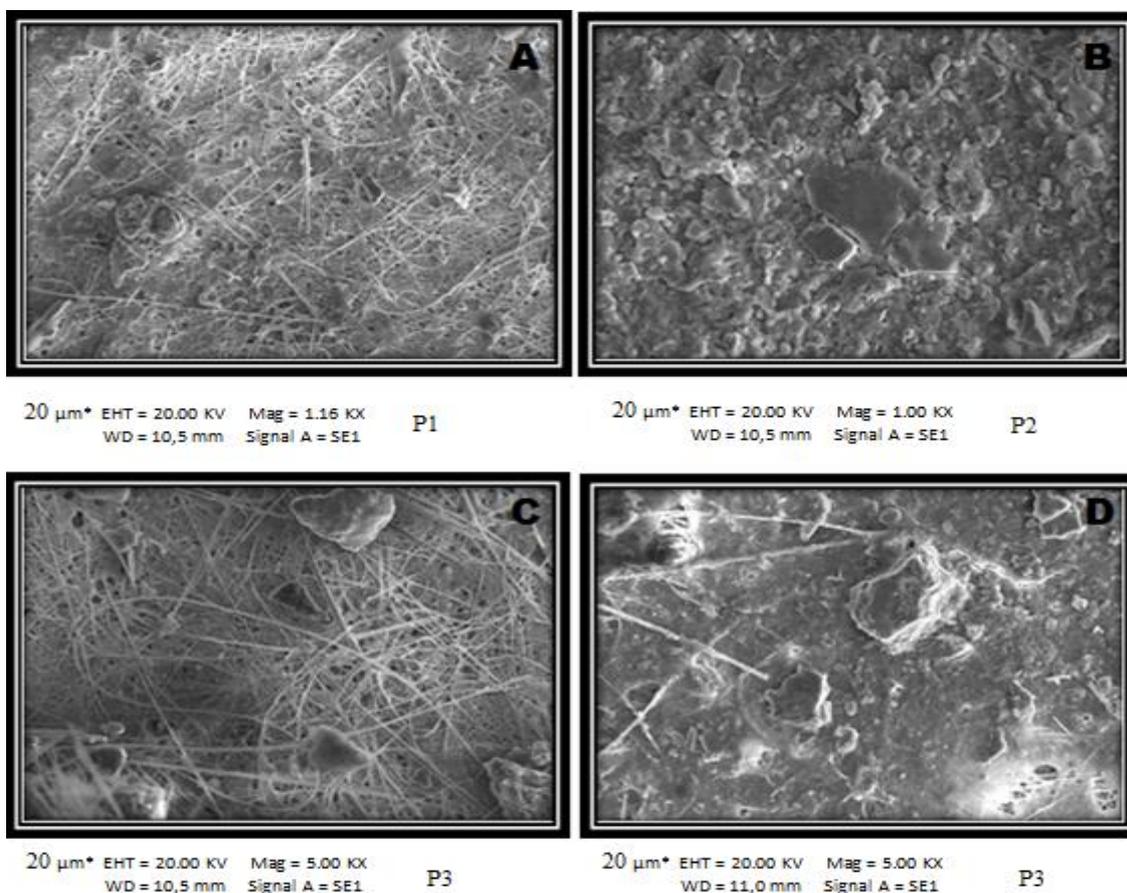
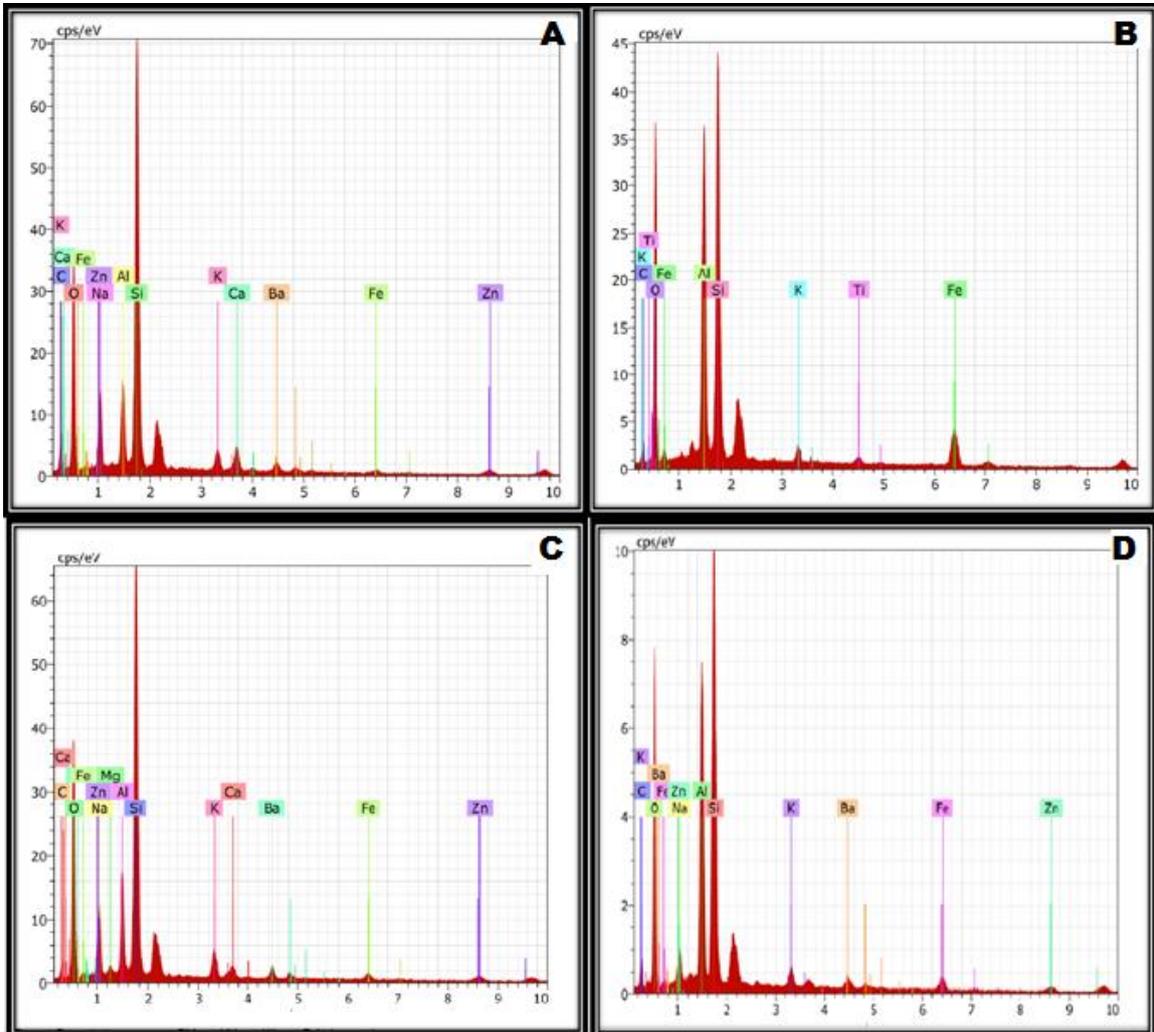


Figura 13 – Espectro - presença de Metais - Amostras: A – (P1) – ponto controle, B – (P2) – Agricultura/pasto, C – (P3) – Confluências de áreas adjacentes, D (P4) – Área urbana – micro bacia do José



Pereira-MG no mês de agosto 2014.

Como consequência do uso e ocupação do solo e dos resíduos sanitários, uma grande quantidade de material tóxico é liberada nas águas superficiais das bacias hidrográficas. Esses xenobióticos não só deterioram o equilíbrio físico-químico do corpo aquático, mas também alteram a rede alimentar e podem trazer mudanças morfológicas, fisiológicas e citogenéticas na biodiversidade aquática. Estudos genotóxicos em organismos aquáticos (incluindo peixes) expostos a águas poluídas que contenham metais pesados têm demonstrado dano ao DNA (VARGAS et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2006).

O elemento Alumínio (Al), assim como ferro, foi encontrado em todos pontos amostrais, e é um dos elementos mais abundante da crosta terrestre. Não é considerado um metal pesado. Os maiores picos foram obtidos nos pontos B (P2), e D: (P4) (Figura 24). Embora não seja considerado um metal pesado, há muitos estudos que visam avaliar o comportamento desta substancia meio aquático, pois em pH ácido o Alumínio (Al) torna-se tóxico. Embora nosso estudo seja meramente qualitativo, não sendo sido possível mensurar a concentração de alumínio presente nas amostras de água, no estudo de revisão bibliográfica descrita por Gensemer et al., (2010), *apud* Freeman e Everhart (1971), observou-se que as concentrações de Alumínio (Al), não deve exceder 100 mg L^{-1} para espécie truta, pois acima desse valor haverá comprometimento do crescimento. Já em outros estudos, Gensemer et al., (2010) *apud* Muniz & Lervested (1980), também concluíram que teores de Alumínio (Al) entre $150\text{-}900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, causam perturbações respiratórias em peixes, entupimento das brânquias, redução nos teores de plasma, bem como alterações no sistema osmorregulatório. De acordo com Savory e Wills (1991), este metal pode levar à perda de eritrócitos e extremos danos branquiais, bem como o colapso em peixe.

Robert et al., (1999) avaliaram também que níveis elevados de Alumínio (Al) diminui a concentração de Cálcio (Ca) e como consequência provoca alterações no desenvolvimento dos peixes.

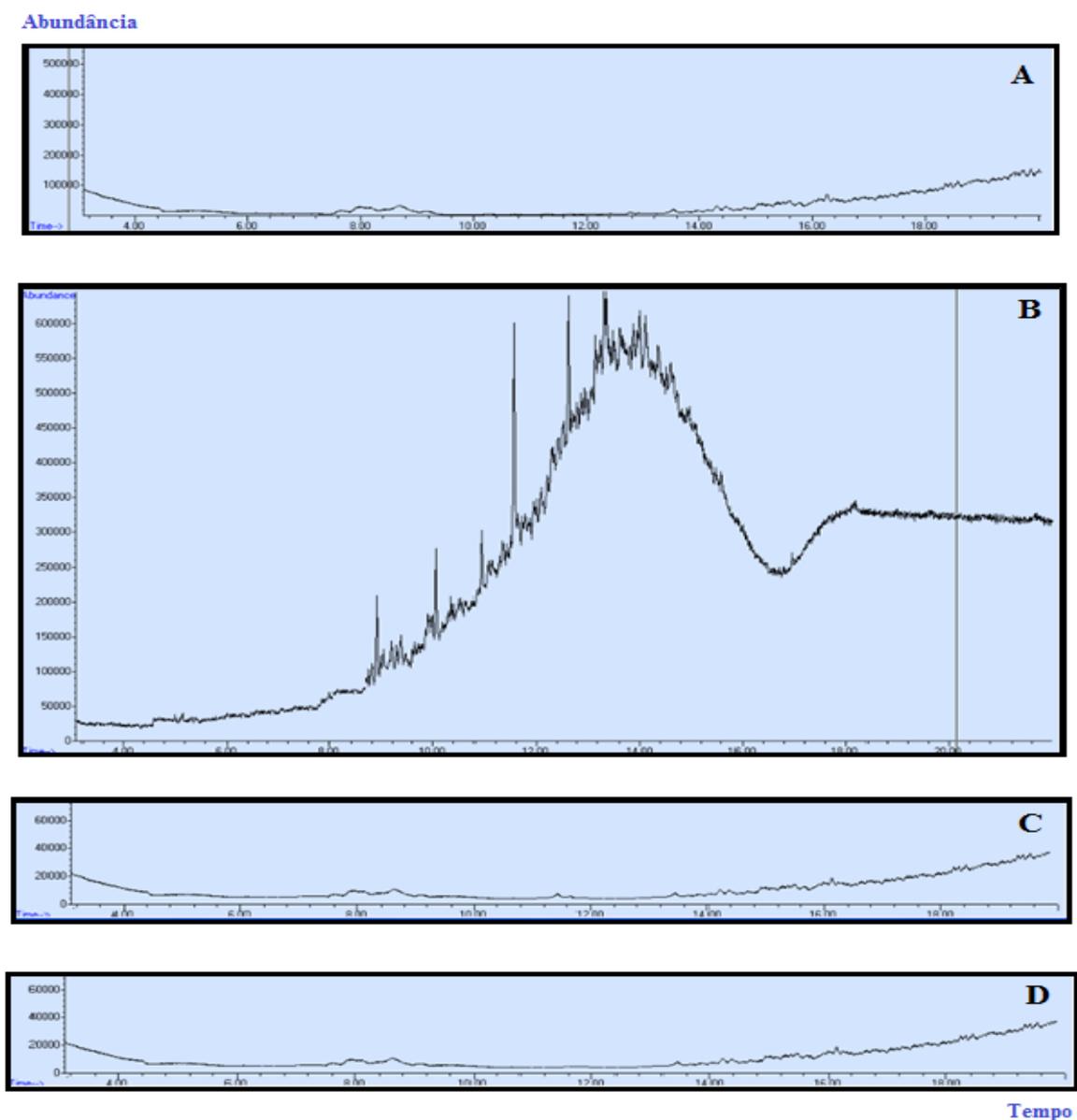
Foi detectado também a presença dos elementos Zinco (Zn) e Bário (Ba) nas amostras coletadas nos pontos (P1) ponto controle, C (P3) pastagem/agricultura, D (P4) área urbana. O Zinco (Zn) é um elemento essencial para manter o equilíbrio nutricional de plantas e peixe, (Lins et al. 2013), no entanto, em concentrações elevadas causam danos nos peixes pois é capaz de provocar alterações branquiais e como consequência a diminuição da capacidade de consumo de oxigênio. Além disso, o Zinco (Zn), pode influenciar em disfunções fisiológicas, alterações em seu desenvolvimento, crescimento e reprodução (SILVANO 2003).

Quanto ao Bário (Ba), trata-se de um elemento encontrado na natureza de forma combinada ou em pequenas quantidades no sedimento e rochas, ou de origem antrópica, provenientes da utilização industrial, entre outros (CETESB 2014). Este elemento pode acumular nos tecidos dos peixes e trazer danos a biota aquática (CASTRO 2006).

O elemento Ferro (Fe), encontrado em todos pontos amostrais, está presente na natureza de diversas formas, principalmente nos alimentos, sendo fundamental para formação da hemoglobina (CASTRO 2006).

Os resultados referentes a determinação de substâncias volatilizáveis e termicamente estáveis nas amostras de água provenientes dos quatro pontos amostrais no mês de Agosto/2014, foram detectadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas - GC/MS (Figura 14), dentro dos limites de detecção instrumental.

Figura 14 – Cromatograma obtido no GC/MS das Amostras: A – (P1) – ponto controle, B – (P2) – Agricultura/pasto, C – (P3) – Confluências de áreas adjacentes, D (P4) – Área urbana – micro bacia do José Pereira-MG no mês de agosto 2014.

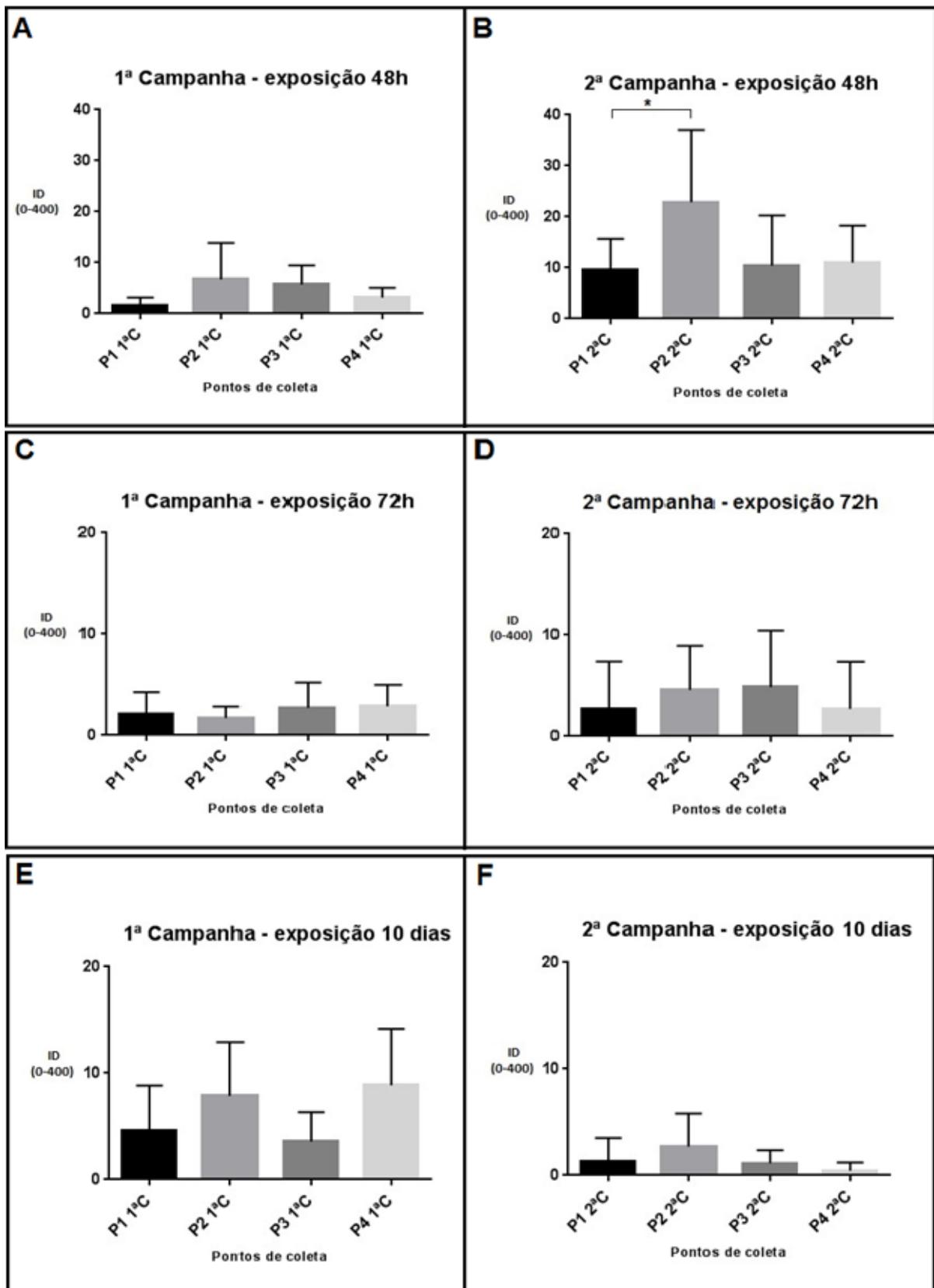


No entanto, tais resultados indicaram apenas a presença destes compostos orgânicos, com maior ênfase na amostra proveniente do Ponto 2 (pastagem/agricultura). Tais resultados indicam que este ponto amostral possui maiores sinais analíticos indicando a presença de muitas substâncias orgânicas as quais necessitam ser melhores investigadas, e quantificadas com base em padrões analíticos. Sabe-se que tais substância em índices elevados podem induzir a lesões celulares, acarretando de forma negativa no ecossistema aquático e na fauna residente.

5.3 - Ensaio cometa

Os valores de índice de dano (ID), e frequência de dano (%D) foram obtidos para todos tratamentos, ou seja, nos quatro pontos de amostragem adotando como controle negativo a amostra de água do ponto P1 (local de abastecimento de água pela COPASA). É possível observar que apenas na exposição por 48h (Figuras 15/ A-B), houve aumento do índice de dano nas células branquiais de *Danio rerio* para as amostras de água proveniente no ponto P2 (área de pequenas pastagens e agricultura) no mês de outubro/14, (campanha 2). Observa-se diferença estatística de comparação entre as médias, comparado ao ponto P1 (ponto controle). No entanto esta diferença estatística não reflete ao grau de impacto na micro bacia, pois o valor encontrado, não foi muito alto (máximo de 22), comparado ao dano máximo que é de 400.

Figura 15: Índices de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª campanhas com exposição de células branquiais de *Danio rerio* em amostras de água da Micro bacia do ribeirão José Pereira por de 48h (A e B), 72h (C e D), 10 dias (E e F). Dunnet com $P < 0,05$.



No entanto, existe a possibilidade de que o dano observado em 48 horas de exposição, tenha sido totalmente reparado decorridos 72h (Figura.15/C e D), pelo fato de que não apresentou diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) comparado ao controle negativo (P1).

Observa-se que em ambas campanhas o número bruto de ID foi inferior para todos os pontos amostrais quando comparado a exposição por 48h, reforçando assim a hipótese de reparo celular a qual persistiu também até 10 dias de exposição (Figuras 15/E e F).

Entretanto, foram observadas diferenças significativas (Teste de Tukey, $P < 0,05$) nos resultados de ID entre as datas amostrais (Figuras 16, 17 e 18). Os resultados confirmaram que o tempo de menor exposição (48h – Figura 13) para amostras de água do Ponto 2 (Área de pastagem/agricultura) apresentaram os maiores índices de Dano nas células branquiais de *Danio rerio*. Porém, para o período de 72 horas de exposição (Figura 14), estas diferenças foram extintas. Isso reforça a hipótese que a exposição das células branquiais de *Danio rerio* nas primeiras horas de ensaio (exposição aguda), foi suficiente para provocar danos, porém reparados posteriormente (72h). Este comportamento mais expressivo no ensaio agudo de 48 horas, pode estar relacionado as primeiras horas do ensaio, sendo de maior impacto aos organismos em contato com afluente da micro bacia do José Pereira – Minas Gerais. Outra possibilidade também pode estar relacionada a outros fatores próprios do mecanismo celular, pois, o nível de dano observado é significativo em relação aos outros pontos amostrais, porém baixo em relação ao número máximo de dano observado. Portanto, este dano pode estar relacionado a morte celular, fato normal que ocorre para manutenção dos seres vivos, eliminando células defeituosas, fatores patogênicos, ou induzidos por fontes de estímulos intracelular ou extracelular, considerado um mecanismo de defesa antineoplásica, e permite a renovação das células (GRIVICIC et al., 2007).

Observa-se também, que a comparação entre as datas amostrais para os ensaios de 10 dias de exposição, que as amostras de água coletadas no período de estiagem (Agosto/2014) provenientes do ponto P2 (pastagem e agricultura) e P4 (área urbana) e no ponto P2 em Outubro/2014 provocaram um aumento no ID nas células branquiais de *D. rerio*, Estas diferenças de comportamento entre as duas campanhas podem estar relacionadas com uma maior concentração de poluentes na época de estiagem (Agosto/14- campanha 1), e no período de maior precipitação (Outubro/14-campanha 2) pela lixiviação de poluentes ao corpo hídrico. Porém o comportamento decrescente do P2

ao P4, pode caracterizar-se também pela diluição de poluentes no período de maior precipitação, os quais estavam acumulados no período de seca. Além disso, cabe ressaltar que esta análise comparativa revelou que a exposição por maior tempo (10 dias), ou seja uma exposição crônica forneceu informações adicionais, não reveladas nos ensaios com curtos períodos de exposição (Figura 18).

Tais informações indicaram por exemplo, que os pontos amostrais P2 e P4, em tempos de estiagem, podem concentrar contaminantes (insumos agrícolas e aporte de efluentes domésticos por exemplo) capazes de provocar danos ao DNA os quais podem comprometer a conservação do ecossistema aquático e que embora, ainda não expressivos o suficiente a ponto de causar grandes danos, fica um alerta para que o monitoramento da qualidade da água na micro bacia do ribeirão José Pereira, seja bastante rigoroso nestes pontos, ou mesmo que sejam implantadas medidas de mitigação para conservação da mesma.

Resultados semelhantes ao presente trabalho, foram encontrados por Orieux (2011), ocorrido no rio Lot/França após exposição de *Danio rerio* em três momentos (3º, 7º, 14º dias de exposição), com amostras de água de três pontos amostrais de diferentes graus de impacto. (Controle, área contaminada por metais e área mais poluída/jusante). Os autores utilizaram amostras de sangue periférico para realização do ensaio cometa. Na região considerada controle, foi realizado os ensaios em todos os tempos de exposição, porém na região contaminada por metais (Cd e Zn) os ensaios foram realizados com 3º e 7º dias de exposição e a jusante no 7º e 14º dias de exposição. Os autores observaram maior ID nos ensaios do 3º dia, com diminuição no 7º dia, na região mais poluída. (Jusante). No grupo controle ocorreram aumento de dano no início do experimento, com a diminuição no 14º dia de exposição, porém sem diferenças estatísticas. Tais resultados reforçam que em determinadas situações um dano provocado por uma exposição aguda, pode ser reparada posteriormente, e que a exposição crônica pode revelar informações adicionais.

No estudo de Souza & Fontanetti (2012), realizado com eritrócitos de *Oreochromis niloticus* por meio do ensaio cometa teve como objetivo avaliar a qualidade da água do Rio Paraíba do Sul, na região de São José dos Campos próximo aos despejos de uma refinaria de Petróleo. Para tanto, foram coletadas amostras de águas no período de seca e chuva em três pontos amostrais, a montante aos despejos da refinaria de petróleo, no ponto próximo aos despejos e a jusante, além do controle negativo (água de

poço artesiano). Os autores observaram que o local próximo aos despejos da refinaria, e a jusante, os níveis de dano foram os mais elevados, verificado por uma exposição de 72 horas. Os autores ressaltam a importância da continuidade de estudos que visam monitorar o ambiente com uso de uma ferramenta de avaliação de genotoxicidade, uma vez que o Rio Paraíba do Sul é um rio importante para a bacia, em função dos seus diferentes usos.

Embora na micro bacia do Ribeirão José Pereira não haja conflito com nenhuma atividade industrial, é preciso que medidas de vigilância sejam aplicadas para monitoramento da mesma, pois há os despejos domésticos, além de possíveis manipulações de insumos agrícolas em pequenas áreas que podem afetar o equilíbrio ecológico do ecossistema.

Figura 16 – Índice de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª Campanha com exposição de 48 horas, com células branquiais de *Danio rerio* expostas às amostras de água da Micro bacia do Ribeirão José Pereira. (Teste Tukey com $P < 0,05$ de significância – Sendo P1 1°C x P2 2°C (***), P2 1°C x P2 2°C (**), P3 1°C x P2 2°C (**), P4 1°C x P2 2°C (***), P1 2°C x P2 2°C (*).

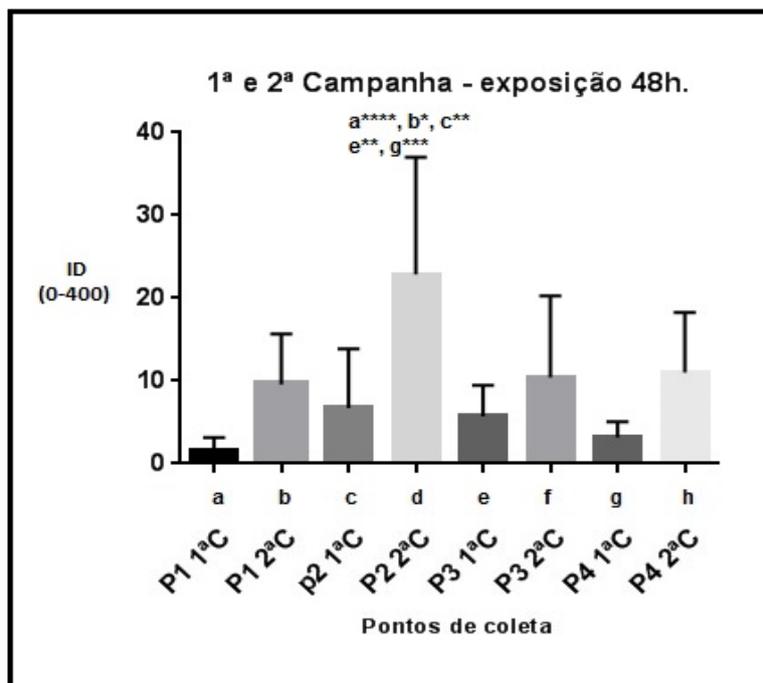


Figura 17 - Índice de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª Campanha com exposição de 72 horas, com células branquiais de *Danio rerio* expostas às amostras de água da Micro bacia do José Pereira. (Teste Tukey com $P < 0,05$ de significância).

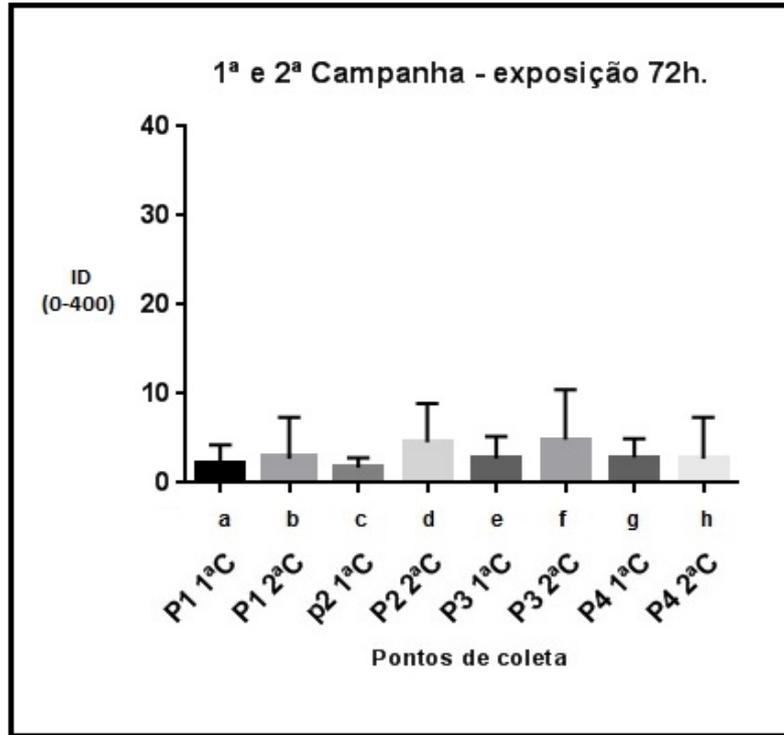
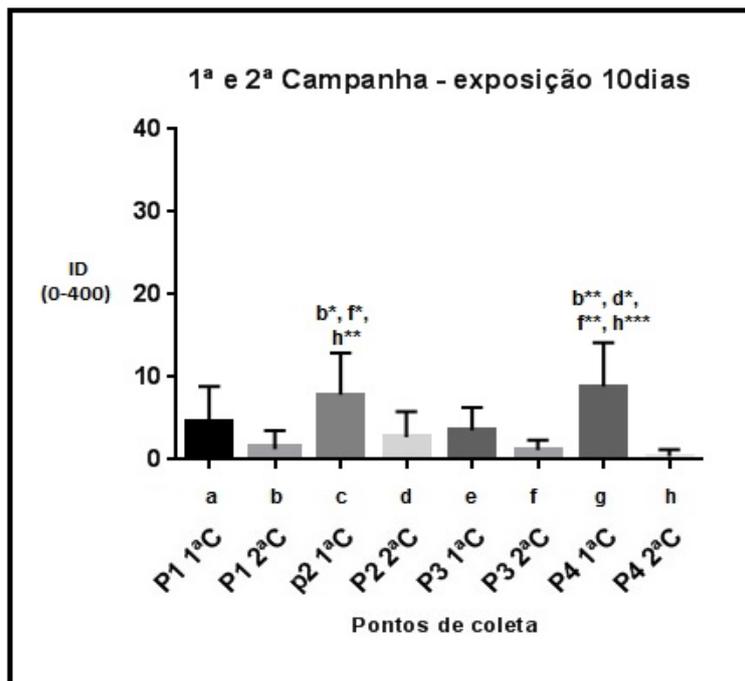


Figura 18 - Índice de dano (ID – 0-400) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª Campanha com exposição de 10 dias, com células branquiais de *Danio rerio* expostos às amostras de água da Micro bacia do José Pereira. (Teste Tukey com $P < 0,05$ de significância – Sendo P2 1ªC x P1 2ªC (*), P2 1ªC x P3 2ªC (*), P2 1ªC x P4 2ªC (**), P4 1ªC x P1 2ªC (**), P4 1ªC x P2 2ªC (*), P4 1ªC x P3 2ªC (**), P4 1ªC x P4 2ªC (***)).



Na Figura 19, é possível observar o comportamento de frequência de dano em todas as campanhas e períodos de exposição os quais encontram - se abaixo dos 15%, o que é considerado um valor baixo. Tal resultado corrobora com valor apresentando na avaliação do índice de dano do Ponto 2 (campanha 2).

Porém os resultados da ANOVA (Teste de Tukey) de comparação entre os pontos amostrais para frequência de dano, revelaram diferenças significativas nos resultados dos ensaios de exposição por (48h) nas amostras do Ponto 2, - (área de pastagem/agricultura) de outubro/2014 (Figura 20), o que corrobora com os valores encontrados para o ID, assim como os ensaios de exposição por 72h (possível reparo) e por 10 dias (exposição crônica), os quais indicaram que possíveis efeitos ao DNA celular das células branquiais de *Danio rerio*, após exposição as amostras de água provenientes dos pontos 2 (agricultura/pastagem) e P4 (área urbana) na época de estiagem. (Figuras 21 e 22).

Figura 19: Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média \pm desvio padrão) da 1ª e 2ª campanhas com exposição de células branquiais de *Danio rerio* em amostras de água da Micro bacia do ribeirão José Pereira por de 48h (A e B), 72h (C e D), 10 dias (E e F) Tukey com $P < 0,05$.

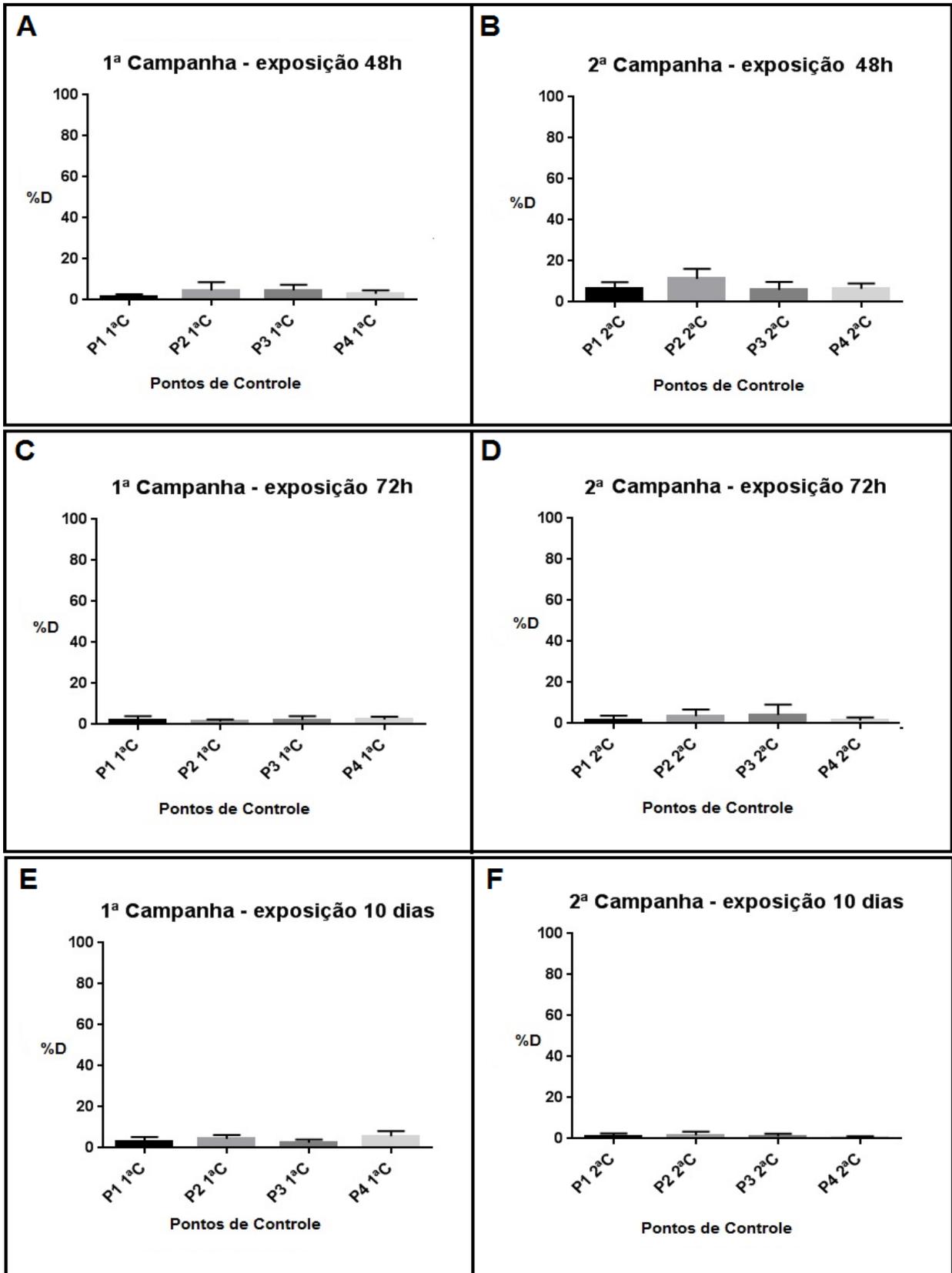


Figura 20 – Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª Campanha com exposição 48horas, em *Danio rerio* com água da Micro bacia do José Pereira. (Teste Tukey com $P < 0,05$) – Sendo P1 1C x P2 1C (*), P2 2C x P1 1C (****), P2 2C x P2 1C (****), P2 2C x P3 1C (****), P2 2C x P3 2C (*), P2 2C x P4 1C (****), P4 2C x P2 1C (*).

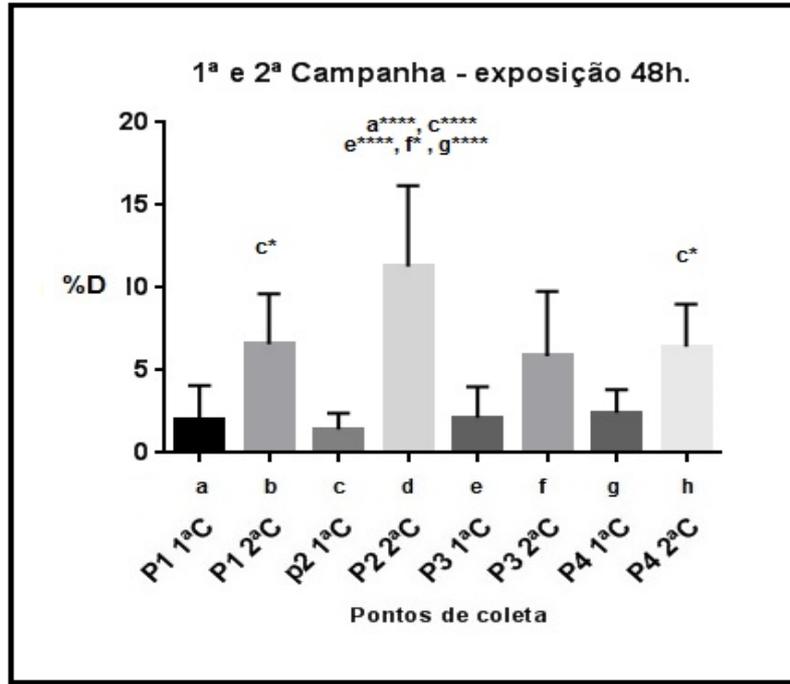


Figura 21 – Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1ª e 2ª Campanha com exposição 72horas, em *Danio rerio* com água da Micro bacia do José Pereira. (Teste Tukey com $P < 0,05$).

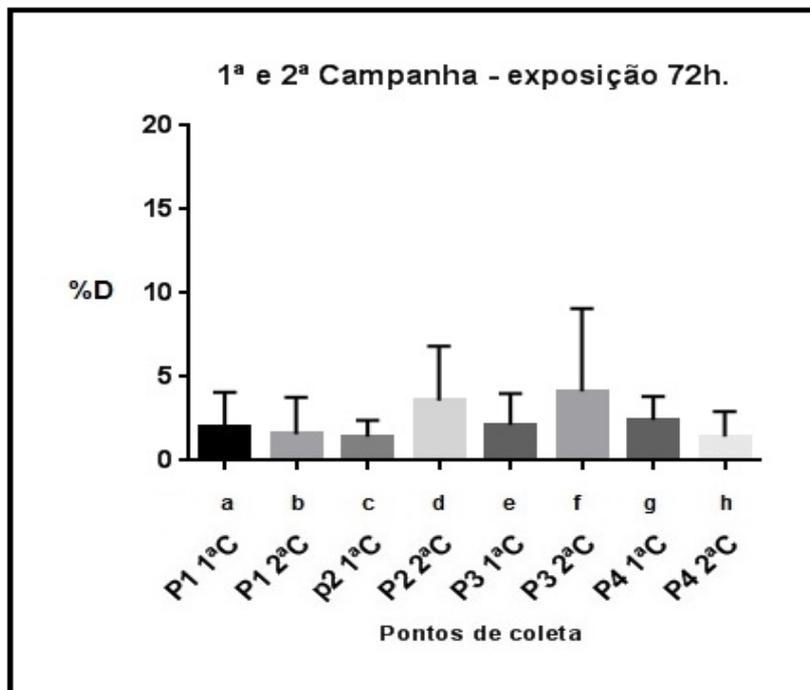
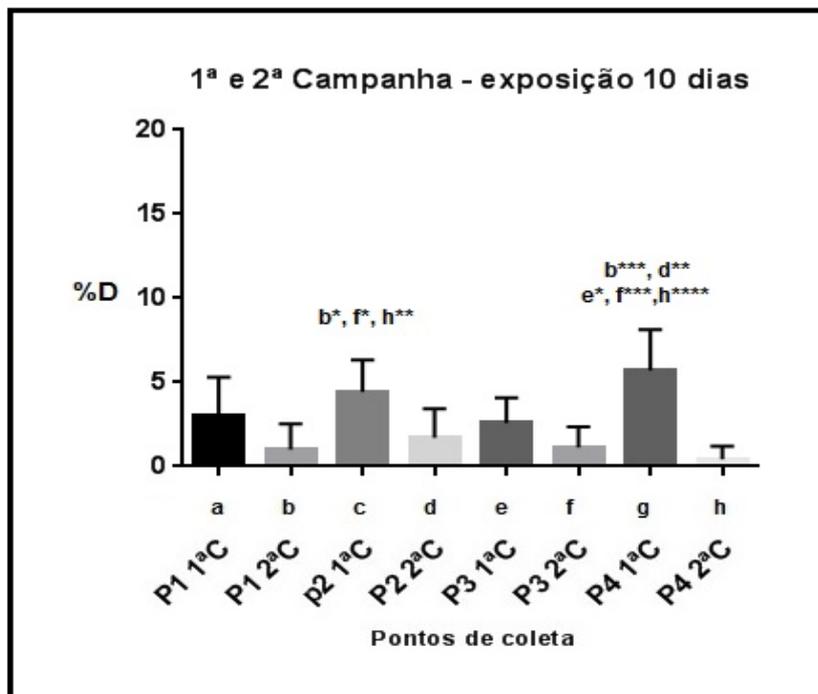


Figura 22 – Frequência de dano (%D – 0-100) estimado pelo ensaio cometa (média ± desvio padrão) da 1^a e 2^a Campanha com exposição 10 dias, em *Danio rerio* com água da Micro bacia do José Pereira. (Teste Tukey com $P < 0,05$) – P2 1C x P1 2C (*), P2 1C x P3 2C (*), P2 1C x P4 2C (**), P4 1C x P1 2C (***), P4 1C x P2 2C (**), P4 1C x P3 1C (*), P4 1C x P3 2C (***), P4 1C x P4 2C (****).



6.0 Conclusões

- Dentre os pontos amostrais avaliados na micro bacia do Ribeirão José Pereira apenas, amostras de água coletada no ponto 2 em Agosto/2014 referente a área de pastagem/agricultura apresentou danos ao DNA após 48h de exposição, porém tal dano foi reparado; podendo ter ocorrido por apoptose (mecanismo de defesa celular), para integridade e renovação celular.
- Uso do ensaio cometa com células branquiais de *Danio rerio* indicaram ser uma ferramenta possível para uso nos programas de biomonitoramento em pequenas bacias hidrográficas;
- Os limites estabelecidos pela Legislação CONAMA/357 das variáveis físicas e químicas permitem classificar o ribeirão José Pereira, como rio Classe II;
- O valor do Índice de Estado Trófico- IET para rios, quantificado com apenas os valores de fósforo total, indicaram que o trecho avaliado é ultraoligotrófico em ambos os períodos amostrais. Tais resultados indicam um bom estado de conservação do trecho estudado descartando a possibilidade de eutrofização. Porém as concentrações de nitrogênio total estão no limite.
- A presença de metais e compostos orgânicos principalmente nas amostras de água proveniente do Ponto 2 (agricultura/pastagem), podem explicar os efeitos ao DNA observados devido a disponibilidade destes poluentes na região, porém tais quantificações necessitam ser realizadas em investigações futuras.

7.0 – Referências Bibliográficas

ABD-ALLAH, G. A.; EL-FAYOUMI, R. I.; SMITH, M. J. A comparative evaluation of aflatoxin B 1 genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research** Amsterdam, v. 446, p. 181-188, 1999.

ABNT/NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes – 2011.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALBERTS, B., JOHNSON, A; RAFF M; ROBERTS K; WALTER P; - **Biologia Molecular da célula** – 5ª Edição – Editora Artmed p.195 – 263, 2010.

ALVES, E. C., SILVA C. F.; COSSICH E. S.; TAVARES, C. R. G.; FILHO E.E. de S., CARNIEL, A.; - Avaliação da qualidade da bacia do rio Pirapó – Maringá, Estado do Paraná, por meio de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos – **Acta. Sci. Technol.** Maringá v. 30, n1, p. 39-48, 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA - American Water Works Association, Water Pollution Control Federation- **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19ª ed, New York, 10 cap, 1995.

ANA – Agência Nacional das Águas. **Indicadores de Estado Trófico**. Disponível em: <http://portalpnqa.ana.gov.br/indicadores-estado-trofico.aspx# ftn1>, acessado em 10 julho de 2015.

ASPREA, M. - **Procedimentos em anestesia e eutanásia** – EMBRAPA – Meio Ambiente – 2013.

BARROS, A. B.; BARROS A. M. A.; - **A difícil aplicabilidade da política de águas no Brasil – Inter Science Place** - Ano 2 - N° 07 Maio/Junho – 2009

BATISTA, T. R.; LUZ, S. R.; SILVA, B. C. Influência da Urbanização nas Vazões Máximas de Pequenas Bacias. **PCH Notícias & SHP News**, v. 14, p. 19-23, 2012.

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 Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.2, p. 465-473, 2003.

BRASIL. Portaria N° 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acessado em: 10 de junho de 2015.

BRASIL - Lei 9433 - Política Nacional de Recursos Hídricos – que estabelece diretrizes para a política Nacional dos Recursos Hídricos, 1997.

BROUGHTON, R. E.; MILAM, J. E.; ROE, BRUCE A. The Complete Sequence of the Zebrafish (*Danio rerio*) Mitochondrial Genome and Evolutionary Patterns in Vertebrate Mitochondrial DNA. **Genome Research**, Oklahoma, v.11, p.1958-1967, 2001.

CASTRO, S. V. - **Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto rio das velhas-MG – 110p.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - 2006.

CEPRENG – Centro de Estudos e Previsão de Tempo e Clima de Minas Gerais – UNIFEI – Itajubá. Disponível em: <http://www.cepreng.unifei.edu.br/> Acesso em jan 2015.

CETESB - **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo** - Apêndice A - Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem - 2009.

CETESB – **Testes de genotoxicidade – Teste Ames, Ensaio Cometa e Micronúcleo** - 2014. Disponível em: <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/ensaios-genotoxicidade-saiba-mais.pdf>> Acesso em 3 jun 2014.

CESTEB – **Ficha de Informação toxicológica – Bário** – 2014 – Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/bario.pdf>> acessado em 3 jun 2015.

CONAMA, “Resolução no 357/2005”. **Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente**. Brasília, 2005.

COPASA - Companhia de Saneamento de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=homecopasa>> acessado jan. 2015.

COSTA C. R.; OLIVI P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação – **Revista Química Nova**, Vol. 31. N. 7 p. 1820-1830 (2008).

Diretriz para pesquisa com *Danio rerio*/ Guidelines/Zebrafish. Disponível em: <<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Zebrafish.pdf>> Acessado. Jan. 2014.

DUARTE, I. D.; DIAS, M. C.; DAVID J. A. O.; MASTSUMOTO S. T.; A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Barsil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – **Revista Brasileira de Biociência** – v.10, n.2, p211-219 , (2012)

DHAWAN A BAJPAYEE M.; Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models - **Cell Biol Toxicol** 25:5–32- (2009).

ESTEVEES, F. A.– **Fundamentos em Limnologia** - 3ª Edição – Editoria Interciência (2011).

FIGUEROA A. - Evaluation of oxidative stress and genetic damage caused by detergents in the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae) - **Revista - Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** /p.528–532, 2013.

FERNANDES, Maurício Roberto - **Sub-bacias hidrográficas unidades básicas para planejamento e gestão sustentáveis das atividades rurais** - III Simpósio de Produção de Gado de Corte - EMATER-MG – 1998.

FILHO, M. T., KITAMURA S., - Câncer pleuropulmonar ocupacional – Occupational lung cancer - **Jornal Brasileiro Pneumologia**. 2006 ;32 (Supl 1): 60-68

FONSECA, J. C. L.; MARCHI M. R. R.; FONSECA, J. C. L.; **Substâncias químicas perigosas `a saúde e ao ambiente** – Editora Cultura Acadêmica – 2008.

FLAUZINO, Bárbara Karoline – **Degradação do solo pela erosão hídrica e capacidade de uso em sub-bacia hidrográfica piloto no sul de Minas Gerais**. (2012) 105p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais – 2012.

GOLTERMAN, H.L. ; CLYMO, R.S. ; OHNSTAD, R. - Methods for physical and chemical analysis of freshwater. 2^a ed. IBP. Handbook, 8, Blackwell .*Sci. Publ.*, Oxford -1978.

GENSEMER R. W., RICHARD C. PLAYLE C. P. - The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic - Environments, Critical Reviews **in Environmental Science and Technology**, n.29, v.4, p.315-450, 2010.

GUPTA T. e MULINS C. M. 2010 - Dissection of Organs from the Adult Zebrafish - **Journal of Visualized Experiments** – v.37, p.1717, 2010.

GYORI B. M.; B. M.; VENKATACHALAM G.; THIAGARAJAN P. S.; HSU D.; CLEMENT M. V.; Open Comet: An automated tool for comet assay image analysis - **Redox Biology**- v.2, p.457–465, 2014.

GRIVICIC, I. REGNE, A. ROCHA, A. B. - Morte Celular por Apoptose Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Canoas Rs, v. 3, n. 53, p.335-343, 2007.

HAFFTER, Pascal et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. **Mutational Analysis Of Zebrafish Development: The Company of Biologists Limited**, Germany, v. 1, n. 123, p.1-17, 1996.

HOFFMAN D. J.; RATTNER B. A.; JUNIOR G. A. B.; JUNIOR JOHN C. Handbook of ecotoxicology –2^a Edição – Editora Lewis – p.19- 24, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Dados sobre a população de Itajubá** – MG – Censo 2010. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=313240>>. Acesso em: 10 fev 2014.

IGAM - Instituto Mineiro de Gestão das Águas - Avaliação da Qualidade das Águas da

Bacia da Lagoa da Pampulha (2013) – Disponível em: <http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/qualidade_aguas/2014/avaliacao-qualidade-das-aguas-lagoa-da-pampulha.pdf> Acesso em: 10 jul 2015.

INMET – Instituto de Pesquisa Espaciais – INPE – Comportamento Climatológico – Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>> Acesso em: 25 fev 2015.

JESUS T.B., CARVALHO C.E.V., Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg) – **Oecologia Brasiliensis**, n.12, v.4, p.680-692, 2008.

JHA, A. N. - Ecotoxicological applications and significance of the comet assay – **Mutagenesis**, Plymouth, v.23, n. 3, p. 207–221, 2008.

KONCA K.; LANKOFF A.; BANASIK A.; LISOWSKA H.; KUSZEWSKI T.; GÓZDZ S.; KOZA Z.; WOJCIK A.; - A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay - **Mutation Research** – n.534, p.15–20, 2003.

KOROLEFF, F. **Determination of nutrients**. In: GRASSHOFF, K., Ed. Methods of sea water analysis. Verlag. Chemie Weinheim., p. 117-181, 1976.

KROKAN H. E., NILSEN H., SKORPEN F., OTTERLEI M., SLUPPHAUG G., - Base excision repair of DNA in mammalian cells – Minireview - **FEBS Letters** 476 - p.73-77, 2000.

LAMPARELLI, M. C. **Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento**. São Paulo. USP/ Departamento de Ecologia. 2004. 235 f. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2004.

LEMONS, N. G.; DIAS, A. L.; SOUZA, A. T. S.; MONTOVANI M. S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli* - **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Paraná, n. 19, p.197–201, 2004.

LOEB A. L., HARRIS C. C., - Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective – **Cancer Res**; n.68, v.17, 2008.

RIBEIRO L. R. (Org.). **Mutagênese ambiental**: A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Canoas/rs: Ulbra, 355 p., 2003.

MACKINEY, G. - Absorption of light by chlorophyll solutions. **J. Biol. Chem.** v.140, p.315-322, 1941.

MAGALHÃES, D. P.; DIAS F.; SILVA A. A ecotoxicologia como Ferramenta de Biomonitoramento de Ecossistemas aquáticos – **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.12, n.3, 355-381, 2008.

MAGALHÃES, D. PAIVA. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública – FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz - **Avaliação de um sistema de análise de imagem em tempo real para monitoramento de efeito tóxico no comportamento natatório do peixe *Danio rerio* (Hamilton 1822)**, 2007.

MALTAURO, R. F.; REIS, J. B. C.; PONS, N. A. D.; FIGUEREDO, A. P. S.; Identificação dos conflitos no uso e ocupação do solo em sub-bacias hidrográficas do Rio Sapucaí no município de Itajubá (MG) - 2013.

MATSUMOTO, ST., MANTOVANI, MS., MALAGUTTI, MIA., DIAS, AU., FONSECA, I.C., MARIN MORALES, M.A.; Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MONTEIRO, T.R., OLIVEIRA L.G., GODOY B. S., - Biomonitoramento da qualidade de água utilizando macroinvertebrados bentônicos: Adaptação do índice biótico BMWP a bacia do rio Meia Ponte – Go. **Oecology Brasilienses**, n.12, v.3, p.553 – 563, 2008.

NAGEL, R. - DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology // TU Dresden, Institut für Hydrobiologie, D-Dresden, **Revista ALTEX** 19, v. 1, n.02, p.38-48, 2002.

NUNES, NETO - Mapa – Bacia Hidrográfica – Ribeirão José Pereira – Confeccionado - ArcGis - 2013.

ODUM E. P. - **Fundamentos em ecologia** – 6ª Edição – Fundação Calouste Gulbenkian 1985.

OLIVEIRA R.; **Zebrafish early life-stages and adults as a tool for ecotoxicity assessment** – **Dissertação** (Mestre) – Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro – 2009

ORIEUX, N.; CAMBIER, S., GONZALEZ P.; MORIN B.; ADAM C.; LAPLACE, J. G.; BOURDINEAUD, J.P.; - Genotoxic damages in zebrafish submitted to a polymetallic gradient displayed by the Lot River (France) - **Ecotoxicology and Environmental Safety** - 74 - 974–983, 2011.

OTTER R. R.; MEIER J.; M.KUBACH K. M.; LAZORCHAK J. M.; KLAINE S. J.; The effects of urbanization on *Lepomis macrochirus* using the comet assay - **Ecotoxicology and Environmental Safety**, South Carolina – E.U.A, n.84, 299-303, 2012.

PARROM L. M.; MUNIZ D. H. F.; PEREIRA C. M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água** – Embrapa – Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária – ISSN 1980-3958, 2011.

PIEDRAS, S. R. N., OLIVEIRA, J. L. R., MORAES, P. R. R., BAGER A., - Toxicidade aguda da amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de *cichlasoma facetum* (jenyns, 1842) - **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 1008-1012, set./out., 2006.

PIRATOBA, ALBA ROCIO AGUILAR - **Avaliação da Influência do Polo Industrial de Barcarena na Qualidade Ambiental dos Recursos Hídricos Superficiais na sua Área de Abrangência** – 79p. Dissertação Mestrado - Universidade do Estado do Pará - 2013.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington, D.C.: Hemisphere, 1985.

RAMSDORF, W. - **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. (2011). Tese de Doutorado área de Genética – Universidade Federal do Paraná, 2011.

ROBERT W. GENSEMER & RICHARD C. PLAYLE - The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic - Environments, Critical Reviews in **Environmental Science and Technology**, n29, v.4, p. 315-450,1999.

SANDERS, M. F., BOWMAN J.L., - **Análise Genética – Uma abordagem integrada** – Ed. Pearson Education (2014) – Disponível em: <<http://unifei.bv3.digitalpages.com.br/users/publications/9788543005911/pages/-24>> acessado em 17/agosto/2015.

SAVORY, J & WILLS, M.R., - In Merian, E. (Ed.). **Metals and Their Compounds in the Environment**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. ch. II.1; 1991.

SANTANA, D. P. - **Manejo Integrado de Bacias Hidrográficas** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - (2003).

SILVANO, J. – **Avaliação de metais na água, no sedimento e nos peixes da lagoa Azul, formada por lavra de mineração de carvão a céu aberto, Siderópolis – SC** - Universidade Federal de Minas Gerais – Dissertação (mestrado) - 2003.

SCALON, M.C.S.; A, RECHENMACHER, C.B.; SIEBEL, A.M.B.; KAYSER, M.L.C.; RODRIGUES, M.T.C.; MALUF, S.W.D.; RODRIGUES, M.; SILVA, L.B.F. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish - **Brazilian Journal of Biology**, Novo Hamburgo, v. 70, n. 4 p. 1217-1222, 2010.

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

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v.2, p.30-33, 2007.

SOUZA T.S.; FONTANETTI C.S. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery - **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São José dos Campos, v.7, n. 2, p.17-22, 2012.

STRICKLAND, J.D.H., PARSONS, T.R. A manual of seawater analysis. **Bull. Fish. Res. Board Can.**, v. 125, p. 1-18, 1960.

SCHERER K., GUIMARÃES S. A. A. G., - Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde - **Revista Destaques Acadêmicos**, vol. 5, n. 3, 2013.

SCHNEIDER, A. C. R. - Implementação de um novo modelo de experimentação animal - Zebrafish. **Revista Hcpa**, Porto Alegre, v. 2, n. 29, p.100-103, 2009.

TICE R.R.; AGURELL E.; ANDERSON D.; BURLINSON B.; HARTMAN 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 toxicology testing – Revista **Environmental and molecular mutagenesis**. N.35, p. 206-221, 2000.

TOWNSEND C. R., BEGON M., HARPER J. L., - Essentials of ecology – Third Edition – Blackwell Publishing - 2008.

TUCCI C. E. M., HESPANHOL I.; NETTO O. M. C. **A gestão da água no Brasil: uma primeira avaliação da situação atual e das perspectivas para 2025**. Instituto de Pesquisas Hidráulicas – IPH, Universidade de São Paulo – USP, Universidade de Brasília – UnB, Janeiro - 2000.

VALDERRAMA, J.C. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. **Marc. Chem.**, v.10, p. 1109-122, 1981.

VARGAS, V.M.F., MIGLIAVACCA, S.B., MELO, A.C., HORN., R.R., FERREIRA, I.C.F.S., PESTANA, M.H.D., Genotoxicity assessment in aquatic environment under the influence of heavy metals and organic contaminants - **Mutation Research**, v. 490, p. 141-158, 2001.

ZENKNER F. F., AQUINO T., ABLING F., DALLEMOLE D. R., KÖHLER A., PRÁ D., RIEGER A. - Avaliação da genotoxicidade do rio pardinho utilizando o ensaio cometa em *Astyanax fasciatus* - Cuvier, 1819 - **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v.25, n.3, P. p.79-93, 2013.

ZAGATTO P. A.; BERTOLETTI E. Ecotoxologia aquática: Princípios e Aplicações São Paulo: Ed. Rima, p. 464, 2008.

ZHU L.; DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental toxicology v.5, p.480- 488, 2011.