

UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS

Priscila Leocádia Rosa Dourado

**BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA SUPERFICIAL EM
ÁREAS AGROINDUSTRIAIS NO MATO GROSSO DO SUL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS
2014

Priscila Leocádia Rosa Dourado

**BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA SUPERFICIAL EM
ÁREAS AGROINDUSTRIAIS NO MATO GROSSO DO SUL**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Alexéia Baruffatti Grisolia

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Ciência Ambiental

**DOURADOS/MS
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

D739b Dourado, Priscila Leocádia Rosa.
Biomonitoramento da qualidade da água superficial
em áreas agroindustriais no Mato Grosso do Sul / Priscila
Leocádia Rosa Dourado – Dourados-MS : UFGD, 2014.
143 f.

Orientadora: Profa. Dr. Alexéia Barufatti Grisolia.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia
Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Água – Qualidade. 2. Recursos hídricos. I.
Grisolia, Alexéia Barufatti. II. Título.

CDD: 628.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Biomonitoramento da qualidade de água superficial em áreas agroindustriais do Cento-Oeste Brasileiro”**, de autoria de **Priscila Leocádia Rosa Dourado**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia
(Orientadora - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales
Membro Examinador (UNESP)

Profa. Dra. Liliam Silvia Candido
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 05 de maio de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Almir e Márcia, minha irmã Rafaela e meu namorado Gustavo, por terem sido essenciais em todos os momentos dessa jornada, me dando força, incentivo e amor para que todos meus objetivos fossem alcançados.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser tão maravilhoso em minha vida, me proporcionando saúde, sabedoria e discernimento para seguir em minha jornada.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia pela orientação durante esses dois anos, pela sua enorme disposição em discutir todos os assuntos dessa pesquisa, por contribuir com meus conhecimentos e compartilhar os seus, por ter me ajudado a crescer cada dia. Obrigada por confiar no meu potencial, por saber, também, ser amiga. Com certeza, todos os ensinamentos serviram muito mais do que experiência profissional, foram uma lição de vida que levarei sempre comigo.

A Universidade Federal da Grande Dourados juntamente com o programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, pelo apoio estrutural e científico.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de Mestrado durante o período de estudo.

À Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira por ter aceitado trabalhar em conjunto com nossa pesquisa, compartilhando seus conhecimentos e contribuindo para a concretização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Joelson Gonçalves Pereira por ter ajudado no delineamento dos pontos de coleta dessa pesquisa, pela confecção dos mapas e por sempre estar dispostos à nos ajudar.

À Profa. Dra. Liliam Silvia Cândido por ter sido fundamental nas análises estatísticas desse trabalho, ter contribuído com seus conhecimentos e por toda a disponibilidade em nos ajudar ao longo desse período.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Raposo Junior pela realização das análises químicas desse trabalho, por ter disponibilizado seu laboratório e por sempre ter sido sempre atencioso ao sanar as dúvidas surgidas.

A Profa. Dra. Cláudia Andréa Lima Cardoso por ter realizado e nos auxiliado na pesquisa de compostos orgânicos. Obrigada pela simplicidade, simpatia e profissionalismo que sempre demonstrou no desenvolvimento dessa pesquisa.

À Profa Dra Maria Aparecida Marin Morales pelo treinamento em mutagênese ambiental que serviu como peça chave para a realização dessa pesquisa. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório, sem nem mesmo me conhecer, ter sido atenciosa e por ter compartilhado seus conhecimentos, contribuindo, muito, para que esse trabalho fosse realizado.

Aos alunos do Laboratório de Mutagênese Ambiental da Universidade Estadual Paulista, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, por terem sido acolhedores e profissionais, compartilhando seus conhecimentos e contribuindo com meu treinamento.

Ao Matheus Mantuanelli Roberto e sua esposa Gleiciane B. Patricio Roberto por terem me recebido em sua casa, sem ao menos me conhecer, terem sido amigos durante minha estadia em Rio Claro, pelas jantinhas, conversas e total disponibilidade com que me receberam. Obrigada pela repecção, desejo, de todo meu coração, um futuro maravilhoso pra vocês.

Aos meus pais por todo apoio no início, por todo o incentivo no decorrer desses dois anos, pela força nos momentos difíceis, por sempre terem uma palavra amiga que me acalmava em todas as dificuldades e sem dúvidas, pelo amor incondicional que sempre tiveram por mim. Agradeço de todo meu coração à Marcia Aparecida da Silva Santos Dourado por ser amiga quando precisa ser amiga e ser mãe quando precisa ser mãe. Obrigada pelos conselheiros, puxões de orelha, conversas, saiba que minha maior força para continuar em qualquer dificuldade vem de todo esse apoio, sem ele jamais seria o que sou hoje. Ao meu pai Almir dos Santos Dourado por acreditar em mim em todos os momentos, por sempre achar que eu sou a melhor e por sempre estar presente na minha vida. Obrigada por buscar sempre demonstrar seu melhor, seja com um sermãozinho, seja com suas brincadeiras ou chatices, sua presença é essencial na minha vida.

A Rafaela da Silva Santos Dourado por ser a melhor irmã que alguém poderia ter. Obrigada pela amizade, companheirismo, conselhos, por sempre estar disposta a escutar meus desabafos, por aguentar minhas chatices e nunca me abandonar. Você é amiga, companheira, conselheira e espero que compartilhem muitas vitórias juntas nessa vida.

Ao Gustavo Bento de Souza Malheiro por ser tão atencioso e prestativo e ter participado dessa jornada desde o dia da minha inscrição. Obrigada pela compreensão nos dias difíceis, por tentar ser paciente, por buscar estar sempre ao meu lado, pelo imenso gesto de amor e carinho, que me fazem feliz a cada dia, pelas mensagens de bom dia naqueles dias nada bons, pelos incentivos para que eu nunca desistisse, enfim, por tudo que sempre fez por mim. Obrigada por ser amigo, parceiro e eterno namorado.

A Monyque Palagano da Rocha pela amizade maravilhosa que construímos ao longo desses anos, pelo incentivo e parceria desde o primeiro momento em que nos conhecemos. Pensei que ganharia uma companheira de coleta, mas o que eu ganhei foi uma amiga que levarei para o resto da vida. Obrigada por todas nossas conversas, festinhas, bebidinhas, vitaminadas, enfim, por tudo que passamos juntas nesses dois anos, por tantos aprendizados.

A Beatriz Vieira da Silva por ter sido muito mais do que amiga, por ter sido uma irmãzinha que escolhi para minha vida. Obrigada por estar ao meu lado me incentivando e apoiando em todos os momentos, por ter me ajudado nas contagens e análises, mas, principalmente, por todas as tardes de gordices e seriados que me faziam relaxar e descontraír, pela paciência nos meus dias bipolar, por ter aberto meus olhos para muitas coisas e ter contribuído sempre para que meus dias fossem mais felizes.

A todos os alunos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Animal e de Biotecnologia Aplicada pelo companheirismo por tantos dias de pesquisa, pelas conversas, piadas, pelos inúmeros momentos de descontração e aprendizagem que, com certeza, farão muita falta nos meus dias. Obrigada Jéssica, Camila e Bruno pela ajuda nas análises laboratoriais e nas intermináveis contagens de células.

Muito Obrigada!

RESUMO

Os córregos da região de Dourados, MS, ao longo de seus cursos, apresentam influências de resíduos provenientes de atividades agrícolas, industriais e da pecuária. O objetivo do trabalho foi monitorar a qualidade da água dos córregos Curral de Arame e Água Boa, por testes citogenéticos, análises microbiológicas e químicas, com intuito de gerar subsídios que auxiliem planos de gestão de qualidade de água. As amostras de água foram coletas no período de Dezembro de 2012 à Novembro 2013 em três pontos que se diferenciam em P1, P2 e P3). A avaliação de ocorrência de metais e compostos orgânicos (pesticidas e antibióticos) na água dos córregos foi realizada por meio de espectrometria de absorção atômica em chamas e cromatografia líquida, respectivamente. Testes com *Allium cepa* e *Astyanax altiparanae* foram realizados para avaliar as propriedades citotóxicas, mutagênicas e genotóxicas da água. As análises das condições microbiológicas da água foram realizadas na água do Córrego Curral de Arame, por meio da pesquisa de Coliformes Totais, Termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Pseudomonas sp.* As análises estatísticas para os biotestes genéticos foram realizadas por meio de teste ANOVA e, quando significativo, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$). O teste de Qui-Quadrado foi usado para os ensaios do cometa. Os resultados referentes à frequência de micronúcleo, ensaio de cometa e testes de *A. cepa* indicaram que houve diferença significativa entre os meses, os pontos coletados (P1, P2 e P3). Os pontos que apresentaram alterações genéticas foram os localizados próximos às culturas agrícolas, ao distrito industrial e próximos à criações de animais (P2 e P3). Nesses locais as análises químicas revelaram maior quantidade de metais e ao presença de antibiótico e pesticidas na água. Os resultados deste trabalho indicam a eficiência dos biotestes para avaliar danos genéticos dos organismos expostos, relacionados à presença de contaminantes, e que pode ser utilizados como ferramentas de controle para planos de gestão de qualidade da água.

Palavras-chave: monitoramento ambiental, mutagenicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, biomarcadores, ambientes aquáticos.

ABSTRACT

The streams of the region of Golden, MS, along their courses, show influences of wastes from agricultural, industrial activities, and livestock. The objective was to monitor the water quality of Curral de Arame and Água Boa streams, by cytogenetic tests, microbiological and chemical analysis, in order to generate data to assist management plans for water quality. Water samples were collected from December 2012 to November 2013 at three points which differentiate into P1, P2 and P3). Assessing the occurrence of metals and organic compounds (pesticides and antibiotics) in water streams was performed by means of atomic absorption spectrometry in flames and liquid chromatography, respectively. Tests with *Allium cepa* and *Astyanax altiparanae* were conducted to evaluate the cytotoxic, mutagenic and genotoxic properties of water. The microbiological analysis of water conditions were performed in water Curral de Arame stream, through research of Total, Thermotolerant, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp coliforms. and *Pseudomonas* sp. The statistical analyzes for genetic biotests were performed using ANOVA and, when significant, the Tukey test ($p < 0.05$) was applied. The Qui-Quadrado was used for testing of the comet. The results concerning the frequency of micronuclei, comet assay and *A. cepa* tests indicated a significant difference between months, the collected points (P1, P2 and P3). The points presented genetic alterations were located close to agricultural, industrial and near livestock operations (P2 and P3) district cultures. In these places the chemical analysis revealed higher amount of metals and the presence of antibiotics and pesticides in the water. These results indicate the efficiency of bioassays to assess genetic damage of exposed organisms related to the presence of contaminants, and can be used as a control for management plans of water quality tools.

KeyWords: environmental monitoring, mutagenicity, cytotoxicity, genotoxicity, biomarkers, aquatic environments.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 Unidades de federação, suas respectivas entidades de representação, número de pontos de monitoramento e pontos com IQA (Índice de Qualidade de Água).	25
---	-----------

CAPÍTULO 2. BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA DO CÓRREGO ÁGUA BOA (DOURADOS, MS)

Tabela 1 Valores médios das análises físico-química de amostras de água dos pontos de coleta (P1, P2 e P3) no córrego Água Boa e água subterrânea do poço da UFGD (P4) durante os meses de Dezembro de 2012 à Outubro de 2013.	64
---	-----------

Tabela 2 Dados de pluviosidade do município de Dourados (MS) nos períodos de coleta.	65
---	-----------

Tabela 3 Determinação de metais das amostras de água do córrego Água Boa durante os seis meses de coleta (dezembro de 2012; fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013).	67
--	-----------

Tabela 4 Determinação de compostos orgânicos na água do córrego Água Boa (Dourados, MS) nos diferentes pontos de coleta.	69
---	-----------

Tabela 5 Médias de índices mitóticos (IM) observadas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) e CP (controle positivo) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013 e valores médios dos pontos em diferentes épocas de coleta.	70
---	-----------

Tabela 6 Médias de índices alterações cromossômicas (IAC) observadas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) e CP (controle positivo) coletadas em nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013 e valores médios dos pontos em diferentes épocas de coleta.	71
--	-----------

Tabela 7 Frequência de células meristemáticas de <i>A. cepa</i> com alterações cromossômicas quando expostas às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) e CP (controle positivo) coletadas em nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013	73
---	-----------

Tabela 8 Médias do número de micronúcleo (MCN) em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013 e valores médios dos pontos em diferentes épocas de coleta. **75**

Tabela 9 Média das diferentes classes de cometa observadas em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos a amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013. **77**

Tabela 10 Fontes da variação, graus de liberdade e quadrados médios referentes ao número de micronúcleos de *A. altiparanae* e para os índices mitótico e de alterações cromossômicas em *A. cepa*. **79**

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA MUTAGÊNICIDADE E CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DO CÓRREGO CURRAL DE ARAME (DOURADOS, MS).

Tabela 1 Análise físico-química das amostras de água dos pontos de coleta (P1, P2, P3, P4) do córrego Curral de Arame durante os meses de Janeiro à Outubro de 2013. **109**

Tabela 2: Dados de pluviosidade do município de Dourados (MS) nos períodos de coleta. **110**

Tabela 3: Determinação de metais das amostras de água do córrego Curral de Arame durante os seis meses de coleta (janeiro à novembro de 2013). **111**

Tabela 4 Determinação de compostos orgânicos na água do Córrego Curral de Arame nos diferentes pontos de coleta (2013). **113**

Tabela 5 Isolados de *Pseudomonas* spp. nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame durante os meses de janeiro à novembro de 2013. **115**

Tabela 6 Médias dos índices mitóticos (IM) de *A. cepa* durante os períodos de coleta (Janeiro/2013 à Novembro/2013) e media total nos pontos de coleta nos quatro diferentes tratamentos (P1, P2, P3 e P4 e controle positivo (CP)). **116**

Tabela 7 Médias dos índices de alterações (IA) de <i>A. cepa</i> durante os períodos de coleta (Janeiro à Novembro de 2013) e media total nos quatro diferentes tratamentos (P1, P2, P3 e P4 e controle positivo (CP)).	118
Tabela 8 Frequência de células de <i>A. cepa</i> derivados de contaminantes presentes nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame durante os períodos de Janeiro 2013 à Novembro 2013.	120
Tabela 9 Médias do número de micronúcleo (MCN) em eritrócitos de <i>A. altiparanae</i> observadas durante os períodos de coleta (janeiro/2013 à novembro/2013) e media total nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4).	121
Tabela 10 Média das diferentes classes de cometa observadas em eritrócitos de <i>A. altiparanae</i> durante os períodos de Janeiro à Novembro de 2013 nos quatro pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4).	123
Tabela 11 Fontes da variação, graus de liberdade e quadrados médios de micronúcleos de <i>A. altiparanae</i> e para os índices mitóticos e de alterações cromossômicas em <i>A. cepa</i> .	124

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA DO CÓRREGO ÁGUA BOA (DOURADOS, MS)

Figura 1: Mapa dos pontos de coleta no córrego Água Boa (P1, P2, P3) e Poço Artesiano da UFGD (P4) na cidade de Dourados/MS. **56**

Figura 2 Apecto visual do local de coleta (1,2 e 3) do córrego Água Boa (Dourados,MS). **56**

Figura 3 Classes de danos de DNA observadas no ensaio cometa de eritrócitos das brânquias de *A. altiparanae*. **63**

Figura 4 Cromatograma referente aos tempos de retenção dos padrões de Thiamethoxam e Carbendazim. Mv (milivoltes), Min (minutos). **68**

CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA MUTAGÊNICIDADE E CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DO CÓRREGO CURRAL DE ARAME (DOURADOS, MS)

Figura 1: Mapa dos pontos de coleta no córrego Curral de Arame (P1, P2, P3) e Poço Artesiano da UFGD (P4) na cidade de Dourados/MS **99**

Figura 2 Pontos de coleta de água (P1, P2 e P3) do córrego Curral de Arame (Dourados, MS). **99**

Figura 3 Classes de danos de DNA observadas no ensaio cometa de eritrócitos das brânquias de *A. altiparanae*. **108**

Figura 4 Cromatograma da oxitetraciclina de amostra de agua coletada no córrego Curral de Arame. **112**

Figura 5 Resultado da análise de Coliformes Totais (NMP/100 mL) das seis coletas realizadas no córrego Curral de Arame, nos pontos 1, 2 e 3. O símbolo (●) representa a presença d *Escherichia coli* no determinado ponto de coleta **114**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICO.....	17
HIPÓTESE.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	22
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	24
2. POLUIÇÃO AMBIENTAL E DANOS GENÉTICOS	26
3. MONITORAMENTO QUÍMICO	28
3.1 Metais	28
3.2 Pesticidas	30
4. MONITORAMENTO BIOLÓGICO.....	32
4.1 Teste citotóxico com <i>Allium cepa</i>	34
4.2 Teste de ensaio de cometa	36
4.3 Teste de Micronúcleo	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO 2. BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA DO CÓRREGO ÁGUA BOA (DOURADOS, MS)	50
RESUMO	51
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Caracterizações do local de biomonitoramento	55
2.2 Coletas de água	57
2.3 Análises Químicas	57

2.3.1 Determinações de Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn.....	57
2.3.2 Determinações de compostos orgânicos	59
2.4 Análises Biológicas	60
2.4.1 Biotestes Vegetais	60
2.4.2 Biotestes Animais	61
2.5 Análise Estatística.....	63
3. RESULTADOS	64
4. FONTES DA VARIAÇÃO	78
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA MUTAGÊNICIDADE E	93
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DO CÓRREGO	93
CURRAL DE ARAME (DOURADOS, MS).	93
RESUMO	94
1. INTRODUÇÃO	96
2. MATERIAL E MÉTODOS	98
2.1 Caracterização do local de Biomonitoramento	98
2.2 Coletas de água	100
2.3 Análises Químicas	101
2.3.1 Determinações de Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn	101
2.3.2 Determinações de compostos orgânicos	102
2.4 Análises Microbiológicas	103
2.4.1 Pesquisas de Coliformes Totais, Termotolerantes e <i>E.coli</i>	103
2.4.2 Pesquisas de <i>Salmonella</i> spp.	104

2.4.3 Pesquisas de <i>Pseudomonas</i> spp	104
2.6 Análises Biológicas	105
2.6.1 Biotestes Vegetais	105
2.6.2 Biotestes Animais	106
2.7 Análise Estatística	108
3.RESULTADOS	109
4. FONTES DA VARIAÇÃO	124
5. DISCUSSÃO	125
6. CONCLUSÃO	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
ANEXO I – FIGURA DE CÉLULAS OBSERVADAS	141
ANEXO I I– NORMAS DA REVISTA PARA PUBLICAÇÃO	143

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ocupação desordenada dos ambientes naturais, após a revolução industrial, vem causando impactos e prejuízos para os recursos hídricos. Os processos de redução da cobertura vegetal, lixiviação e erosão ocorridos nos ambientes, podem ocorrer independentemente da ação humana e trazer danos para o meio ambiente (Batista & Dias 2008).

Muitos organismos pertencentes a ecossistemas encontram-se em locais próximos a rios e ambientes naturais localizados próximos às zonas urbanas e industriais e, por isso, acabam sendo utilizados como fontes de alimentos, recursos habitacionais e industriais, comprometendo, assim, a preservação dos recursos naturais (Moore et al. 2004).

Os ambientes aquáticos estão expostos à ação antrópica responsável por diversos tipos de contaminação. Dentre elas destacam-se a descarga de efluentes industriais, os processos agrícolas e os esgotos domésticos lançados nos recursos hídricos que contribuem para a contaminação e degradação dos ambientes aquáticos (Philippi Jr & Pelicioni 2005).

A contaminação dos ambientes naturais por poluentes químicos, domésticos e industriais, em especial dos ambientes aquáticos, é um problema que cresce exponencialmente, pois os esses ambientes constituem o destino final da maioria desses contaminantes. Os organismos aquáticos, como peixes acumulam poluentes presentes na água, de forma direta ou indireta (cadeia trófica), podendo ser responsáveis pela chegada de produtos químicos ao homem (Claxton et al. 1998; Matsumoto et al. 2006).

Os xenobióticos são compostos químicos introduzidos nos ambientes naturais devido ao lançamento de produtos químicos derivados de atividades antrópicas (Van der Oost et al. 2003). Esses compostos químicos, muitas vezes, são substâncias tóxicas, como os pesticidas, metais e outras substâncias decorrentes da urbanização e das atividades industriais que podem agravar as condições ambientais e até mesmo os ecossistemas (Christofolletti 2008).

Os recursos hídricos que recebem efluentes de polos industriais e de áreas agrícolas podem ser degradados por substâncias químicas com atividades genotóxicas e mutagênicas levando a alterações, por exemplo, na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular (aneugênicas) ou induzindo quebras e alterações

na estrutura dos cromossomos (clastogênicas) dos organismos expostos (Rabello-gay et al. 1991; Hoshina 2005).

Bioindicadores de poluição ambiental são organismos utilizados para analisar os efeitos biológicos de xenobiontes (Pedro 2008; Mota et al. 2009) pois são sensíveis aos agentes poluidores e, conseqüentemente, capazes de detectar seus efeitos isolados ou em misturas. Dentre os bioindicadores indicados para este fim, podemos destacar a *Allium cepa* e alguns peixes, como *Oreochromis niloticus* e *Astyanax sp.*

A *A. cepa* é amplamente utilizada como bioindicador de avaliações ambientais, devido suas características de proliferação celular, número reduzido de cromossomos, facilidade de cultivo em qualquer época do ano (Matsumoto et al. 2006; Leme & Marin-Morales 2009).

Testes utilizando peixes são eficientes para determinação de compostos químicos nos ambientes naturais, pois apresentam capacidade de responder aos tóxicos de modo similar ao dos grandes vertebrados, além de serem encontrados abundantemente nos ecossistemas, o que possibilita a identificação de contaminantes emergentes (Al-sabti & Metcalfe 1995; Ramsdorf 2007).

Além disso, é importante que sejam mensurados nas avaliações ambientes diferentes parâmetros, tais como potenciais de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, além de parâmetros químicos e físico químicos (Souza 2010).

Diante da expansão agroindustrial do Estado do Mato Grosso do Sul, que cresce de forma exponencial e da escassez de estudos referentes à contaminação dos recursos hídricos na região de Dourados (MS), objetivou-se determinar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da água do córrego Água Boa, por meio de bioensaios realizados em animais e vegetais e da determinação de compostos orgânicos, a fim de contribuir com informações referentes à qualidade desses ambientes aquáticos, gerando ferramentas auxiliares para programas de biomonitoramento e conservação.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral contribuir com informações referentes à qualidade da água de ambientes aquáticos naturais da região de Dourados/Mato Grosso do Sul, a fim de gerar ferramentas auxiliares para planos de controle de qualidade de água de córregos pertencentes à Bacia do Rio Dourados em Dourados/MS

➤ **Objetivos Específicos**

- Avaliar se a quantidade de metais presentes na água de córregos pertencentes à Bacia do Rio Dourados, no município de Dourados/MS, estão em acordo com a legislação vigente;
- Detectar a existência de pesticidas agrícolas na água de córregos pertencentes à Bacia do Rio Dourados, no município de Dourados/MS;
- Determinar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de água provenientes de córregos pertencentes à Bacia do Rio Dourados, no município de Dourados/MS, por meio de testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade com *Allium cepa* e *Astyanax altiparanae*.

3 HIPÓTESE DA PESQUISA

Considerando as características ambientais e as influências antrópicas, advindas de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, as águas superficiais dos córregos do município de Dourados apresentam substâncias tóxicas que comprometem a qualidade desses mananciais e induzem danos genéticos em organismos vivos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Sabti K, Metcalfe, CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343:121-135.

Batista GT, Dias NW (2008) Ocupação do solo urbano: Desafio pós Estatuto das Cidades. Universidade de Taubaté 22p.

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

Christofoletti CA (2008) Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Claxton LD, Houk VS, Hughes TJ (1998) Genotoxicity of industrial waste and effluents. *Mutat. Res* 410:237–243.

Ferraro MVM (2009) Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos. Tese, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682:71-81.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MI, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA (2006) Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. *Genet. Mol. Biol* 29:148-158.

Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard DRP (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552:247-268.

Mota GGP, Barboni SAV, Jesus MC (2009) Tilápias (*Actinopterygii: Cichlidae*) comercializadas em Feira de Santana (Bahia) como bioindicadores de poluição ambiental em rios da Bacia do Paraguaçu. *Pesticidas: R Ecotoxicol e Meio Ambiente* 19:11-18.

Pedro J (2008) Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa*. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Philippi Jr A, Pelicioni MCF (2005) Educação ambiental e Sustentabilidade. Editora USP 3:878p.

Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Maonteleone Neto R (1991) Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e criterios de avaliação. Editora SBG 113-121.

Ramsdorf W (2007) Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

Souza VM (2010) Bioindicadores animais de metais poluentes. Dissertação, Departamento de Ecologia, Universidade Católica de Goiás.

Teixeira JP (2008) Avaliação dos efeitos tóxicos e genotóxicos do inseticida imidacloprido em *Artemia salina* e *Allium cepa* l. Trabalho de Conclusão de Curso, Gestão de Recursos Naturais, Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environment Toxicol and Pharmacol* 13:57-149.

5 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho está apresentado na forma de capítulos, como segue:

Capítulo I trata-se de Revisão Bibliográfica referente à poluição ambiental e os consequentes danos genéticos, induzidos nos organismos vivos; bem como os principais testes utilizados em monitoramento ambiental.

Os Capítulos II e o III referem-se às pesquisas de monitoramento da qualidade de água de córregos pertencentes à Bacia do Rio Dourados (Dourados, MS), que recebem influências antrópicas e industriais.

Os capítulos I, II e III foram apresentados de acordo com as normas da revista, *Environmental Science and Pollution Research*, descritas no Anexo II.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Contextualização

As bacias hidrográficas têm sido deterioradas, principalmente, em consequência da expansão urbana, descarga de efluentes agrícolas e industriais, desmatamentos de áreas de proteção ambiental e, conseqüente, assoreamento dos rios (Barros et al. 2005).

A água utilizada para atividades socioeconômicas de abastecimento da população é proveniente de rios, lagos, represas e aquíferos subterrâneos, que muitas vezes podem ser afetados por ações antropogênicas relacionadas aos despejos de efluentes domésticos e agroindustriais. Dessa forma, torna-se importante distinguir quais características foram produzidas pelo homem, pois esses mananciais são fontes disponíveis de água para população sanear suas necessidades (Silveira 2007). Devido à expansão populacional o consumo de água tem aumentado, significativamente, levando a realização de pesquisas com o intuito de encorajar o uso racional desse recurso (Biagini et al. 2009).

No Brasil, foram criadas agências regulatórias da qualidade de água para fiscalizar a prestação de serviços públicos, praticadas pela iniciativa privada, que estabelecem regras para a utilização dos recursos hídricos. A Agência Nacional de Águas (ANA), vinculada ao Ministério do Meio Ambiente, foi criada no ano 2000, com intuito de controlar os recursos hídricos brasileiros e assegurar a atual e as futuras gerações a disponibilidade e padrões de qualidade de água adequados aos seus respectivos usos. O primeiro “Panorama de Qualidade das Águas Superficiais do Brasil”, elaborado em 2005, no entanto, apenas em 2010 esse plano foi ampliado pelo “Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das Águas (PNQA)”, servindo de apoio para conhecimento sobre a qualidade das águas superficiais do Brasil, orientando e elaborando políticas que visem à recuperação da qualidade ambiental (ANA 2012).

Atualmente, existem 27 unidades federais que realizam o monitoramento das águas superficiais, totalizando 3411 pontos amostrais ativos e inativos em todo o Brasil. Entretanto, a distribuição desses pontos é desigual e apenas, 2167 pontos estão ativos para a realização do Índice de Qualidade de Água (IQA). Além disso, cada unidade federal, através de entidades responsáveis adotam critérios próprios de localização dos pontos, frequência de amostragem e parâmetros analisados (Tabela 1).

Tabela 1 – Unidades de federação, suas respectivas entidades de representação, número de pontos de monitoramento e pontos com IQA.

Unidade de Federação	Entidade	Pontos de Monitoramento¹	Pontos com IQA
Alagoas	IMA	18	18
Bahia	INEMA	294	216
Ceará	COGERH	396	43
Distrito Federal	ADASA/CAESB	81	46
Espírito Santos	IEMA	84	77
Goiás	SEMARH	57	55
Mato Grosso	SEMA	151	82
Mato Grosso do Sul	IMASUL	235	84
Minas Gerais	IGAM	531	488
Paraíba	SUDEMA	136	68
Paraná	IAP/ÁGUAS PARANÁ	314	213
Pernambuco	CPRH	133	38
Rio de Janeiro	INEA	120	22
Rio Grande do Norte	IGARN	211	94
Rio Grande do Sul	FEPAM	187	36
São Paulo	CETESB	408	360
Tocantins	SENATINS	55	48
TOTAL		3.411	1.988

Fonte: Agência Nacional de Águas – Panorama da Qualidade de águas superficiais do Brasil – 2012¹
Pontos de monitoramento incluindo pontos desativados durante o período 2001-2010.
IQA – Índice de Qualidade de Água

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) está ligada à Organização Mundial da Saúde e utiliza, como base, para análise dos respectivos padrões da qualidade dos corpos de água a Resolução número 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 2005.

A avaliação da qualidade de água doce pela Cetesb é realizada por meio de análises temporais e espaciais, sendo que as temporais estão relacionadas com a comparação dos dados obtidos no ano atual com os últimos cinco anos e a espacial está

relacionada com a elaboração de perfis sanitários dos principais corpos hídricos, a fim de se identificar os trechos mais poluídos.

O Instituto do Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul (IMASUL) controla a qualidade dos recursos hídricos desse Estado desde 1992, pelo Programa de Monitoramento da Qualidade das Águas do Mato Grosso do Sul. Dentre os 235 pontos de monitoramento ativados e desativados, monitorados pelo IMASUL/MS, encontra-se o córrego Água Boa, pertencente à Bacia do Rio Ivinhema, que apresenta grande importância econômica para o município de Dourados, visto que percorre grande parte da periferia, aufere áreas agrícolas e desagua no Rio Dourados, que abastece parte da população da cidade.

O IMASUL adota metodologia de análise de águas similar à utilizada pela CETESB e fornece subsídios ao controle da poluição das águas, por meio de parâmetros físicos, químicos, biológicos, de sedimentos, dados estes que contribuem para o uso adequado dos recursos hídricos do Estado (Imasul 2010).

Para analisar esses parâmetros, é utilizado o IQA que serve de complemento para as ações de preservação dos corpos hídricos, possibilitando a proteção destes ambientes, conforme a necessidade do uso que se faz de suas águas. Esse índice foi adaptado do Índice de Qualidade das Águas desenvolvido pela National Sanitation Foundation (NSF), baseado na técnica de Delphi Rand Corporation (Imasul 2010), sendo que os principais parâmetros analisados por esses órgãos são temperatura, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, pH, número mais provável de coliformes, nitrogênio total, fósforo total, turbidez e sólidos totais (Souza 2007) e estão relacionados com o índice de poluição ambiental dos recursos hídricos.

2 Poluição ambiental e danos genéticos

O ambiente aquático, por ser o destino final de todo poluente, sofre impactos causados pelo despejo de pesticidas, metais pesados, diversos resíduos provenientes da indústria e de esgoto doméstico (Akaishi et al. 2004). Dessa forma, os impactos nos ambientes aquáticos naturais vêm crescendo gradativamente, nos corpos de água próximos a áreas rurais e industriais, podendo causar danos no material genético de

muitos organismos vivos, modificando-o e prejudicando seus processos vitais (Peron et al. 2009; Costa & Menk 2012).

Os agentes químicos podem ter diversas ações, dentre elas, os efeitos genotóxicos ou mutagênicos. Os primeiros causam alterações ou danos na fita de DNA (adutos de DNA, lesões na fita de DNA, alterações na síntese de DNA) e se caracterizam por alterações que podem ou não serem reparadas.

Já os agentes mutagênicos são aqueles que, quando presentes nas células dos organismos, induzem mutações gênicas e/ou cromossômicas que não podem ser reparadas ao longo dos anos, se caracterizando em alterações permanentes e transmissíveis aos descendentes (Dearfield et al. 2002; Caritá 2010).

A mutagenicidade é um efeito tóxico que danifica o material genético da célula, causando mudanças no DNA e nos cromossomos, decorrentes da ação de compostos químicos sobre os organismos (Hoshina 2005; Guerra 2009).

Os efeitos tóxicos de poluentes não se restringem, apenas, aos ecossistemas aquáticos, pois muitas dessas substâncias causam efeitos à saúde humana, como anomalias reprodutivas, defeitos congênitos e o câncer. Na maior parte das vezes, esses efeitos não podem ser detectados diretamente, devendo ser analisados por métodos biológicos, que garantam a confiabilidade dos resultados (Hoshina 2005; Peron et al. 2009).

Os impactos causados na saúde humana por agentes tóxicos presentes no ambiente podem ser analisados por meio de avaliações biológicas (toxicidade aguda e até testes de genotoxicidade) que, em alguns países, são obrigatórias para as descargas de efluentes, enquanto que em outros, os impactos são avaliados, apenas, por suas propriedades químicas e físicas (Gana et al. 2008).

Estudos demonstraram que a presença de pesticidas e metais na água de rios e córregos (Fernandes et al. 2007; Kruger 2009) pode acarretar danos ao material genético (células poliploides, quebras cromossômicas, micronúcleos, danos ao DNA entre outros) apresentando diferentes ações nas células dos organismos que habitam esses ambientes.

Pesquisas que avaliam danos no material genético dos seres vivos, relacionados a substâncias químicas presentes em poluentes ambientais, são de grande importância para o monitoramento ambiental. Sendo assim, o uso de parâmetros biológicos permite distinguir os efeitos das ações humanas sobre os organismos, subsidiando o

biomonitoramento para o uso da água, e as ações de manejo para conservação e preservação dos ambientes aquáticos (Buss et al. 2003).

3 Monitoramento Químico

3.1 Metais

Os metais nem sempre apresentam riscos para os ecossistemas, visto que, em baixíssimas concentrações, participam de muitos processos fisiológicos e são denominados elementos essenciais (Cu, Fe, Mn, Co, Se, I e Cr). Já em concentrações elevadas, eles podem alterar as atividades vitais de muitos organismos (Oliveira 2003; Patra et al. 2004; Souza 2010).

Dessa forma, os estudos com metais vêm sendo realizados, principalmente, após os acidentes ambientais como o ocorrido na Bacia de Minamata no Japão, devido à contaminação de arroz com mercúrio, contaminando grande parte da população que se alimentava dos peixes e mariscos da região (Dias 2004; Castro 2006). Isso acontece, pois os metais constituem classes de poluentes com ação mutagênica, genotóxica e citotóxica, que podem contaminar os ecossistemas (Christofolletti et al. 2013; Carità 2010).

Os efluentes industriais são as principais fontes de contaminação por metais, devido à utilização desses pelas indústrias nas diversas linhas de produção, que acabam por lança-los nos corpos de água. É importante se considerar que há diversas fontes de contaminação por metais, como as originadas pelo lixo, atividades de mineração e efluentes urbanos, que levam a contaminação dos ecossistemas aquáticos (Farias et al. 2007).

Os metais, quando em contato com os organismos, induzem a efeitos biológicos adversos, como a genotoxicidade e carcinogenicidade, podendo ocasionar lesões genômicas, por isso, torna necessária a caracterização dos efeitos causados por esses compostos e seus metabólitos (Leffa & Andrade 2008).

Os animais e plantas podem apresentar concentrações de metais em níveis acima aos encontrados no ambiente, principalmente os peixes, pois são considerados os elementos mais indicativos para a estimativa da concentração de metais em água doce (Papagiannis et al. 2003).

A contaminação de animais por metais presentes na água acontece por etapas de absorção; em que primeiro acontece pela absorção direta, por meio dos metais presentes na água, pele, brânquias, em seguida, absorção indireta pela alimentação e entrada dos metais no organismo, que são transportados no sangue e se acumulam nos órgãos (rins, musculo, fígado), podendo afetar diversos processos vitais (Heath1995).

Os metais Co, Ag, Cu, Fe, Mn, Cd, Zn, Pb, Ni, Ca, Al, Mg e Cr foram quantificados, por meio de Espectroscopia de Absorção Atômica, em águas superficiais da Bacia do Paraguai. As análises comprovaram a presença de Ca, Cu, Mn, Ni, Zn e Pb acima dos limites permitidos para a água dos rios estudados, sendo que estes metais em concentrações elevadas podem acarretar contaminação dos ecossistemas aquáticos, que podem levar aos danos nos seres vivos expostos (Sampaio 2003).

A determinação da presença de metais (Pb, Na, Hg, K, Au, Ni, Zn, Se, Cu, Ca, Fe solúvel, Fe total, Mg, Ba, Cr trivalente, Cr hexavalente, Ca etc.) encontrados nos ambientes, aquáticos devido a descartes de efluentes industriais e atividades urbanas, foram avaliadas por Espectrometria de absorção atômica e de análises com organismos (comunidades bentônicas e comunidades locais). Os estudos indicaram que a maior parte dos metais analisados estava acima do permitido pela Legislação Brasileira (CONAMA) e seus efeitos foram visíveis sob os organismos analisados, concluindo que os metais lançados nos rios modificam e impactam a estrutura de todo o ecossistema aquático (Castro 2006; Farias et al. 2007; Ferreira 2009).

Os efeitos genotóxicos dos metais sobre as plantas foram analisados por Fiskesjö (1983), a fim de identificar a interação dos organismos com o meio ambiente impactado, pois os metais podem causar diversas alterações nas células das plantas, interrompendo o crescimento das raízes, mudando a morfologia radicular, causando danos oxidativos, diminuição no índice de divisão celular, apoptose, c-metáfase, aderências cromossômicas, pontes cromossômicas, formação de micronúcleos entre outros, demonstrando seu potencial genotóxico sobre esses organismos (Fusconi et al. 2006; Marcano et al. 2006).

Os efeitos do cádmio em *Pisum sativum L. cv. Frisson* foram analisados por Fusconi et al. 2006 com diferentes concentrações desse composto, durante 24 horas, quanto o crescimento radicular, índice mitótico e alterações cromossômicas da referida planta. Esse estudo indicou que o cádmio bloqueou quase totalmente o crescimento das plantas tratadas, afetando, significativamente, o índice mitótico e induzindo alterações

celulares, confirmando seu potencial como contaminante emergente que afeta as células de organismos.

A genotoxicidade do rio Pitimbu (Natal/RN), que recebe efluentes industriais, foi analisada através do teste com *Allium cepa*, durante 2 meses do ano de 2003. Os resultados indicaram que os locais onde houve maiores índices de metais potencialmente tóxicos (alumínio, cobre, ferro e zinco) na água deste rio, apresentaram maiores quantidades de alterações cromossômicas na raiz de *A. cepa*, sugerindo a ação tóxica desses compostos ao organismo-teste utilizado (Egito et al. 2007).

A determinação dos metais e suas concentrações na água e no ambiente são de grande importância em estudos de monitoramento, visto que muitos danos causados aos organismos são decorrentes da presença desses compostos. Esses estudos auxiliam na detecção dos efeitos causados pelos mesmos nesses organismos e no meio ambiente (Souza 2010).

3.2 Pesticidas

A agricultura brasileira, durante os últimos 40 anos, sofreu inúmeras mudanças que alteraram o processo de sistema de produção agrícola, intensificando o uso de insumos, máquinas, fertilizantes e agrotóxicos sem os cuidados necessários, contribuindo para a degradação ambiental, aumento das intoxicações e alterações no funcionamento dos ecossistemas (Braguini 2005; Kruger 2009).

O Brasil está entre os três maiores consumidores mundiais de produtos da agricultura, movimentando bilhões de dólares todos os anos e utilizando diversos compostos em suas culturas agrícolas. Esse histórico alerta para os riscos de contaminação dos recursos hídricos que são o destino final dos produtos utilizados na agricultura (Armas et al. 2007).

O Estado do Mato Grosso do Sul está entre os nove maiores consumidores desses produtos no Brasil, principalmente, nas culturas de algodão, arroz, cana-de-açúcar, feijão, milho, soja e trigo, concentradas nas regiões norte-nordeste e sul do Estado (Pires et al. 2005). Por esse motivo, os agrotóxicos são os produtos mais encontrados nos corpos de água superficiais e subterrâneos, compreendendo uma variedade de moléculas distintas e pouco conhecidas, que conferem diferentes efeitos sobre o meio ambiente e sob os organismos (Ritter 1990; Armas et al. 2007).

A contaminação dos rios por pesticidas pode ocorrer tanto por via direta, por meio de aplicações destes químicos no controle de algas e insetos, lançamentos de efluentes domésticos e industriais sem tratamento, quanto de maneira indireta, quando são utilizados biocidas nos solos (Maraschin 2003).

A entrada dos pesticidas no meio aquático, proveniente da prática agrícola, depende da dinâmica desses compostos no solo, uma vez que sua movimentação contribui de forma significativa para a sua chegada ao meio aquático (Isense 1991; Maraschin 2003).

A preocupação com ambientes aquáticos aumenta quando a água é utilizada para abastecimento da população. Nesse caso, o limite exigido pela União Européia é de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para qualquer agrotóxico utilizado, independente do seu potencial toxicológico (Griza et al. 2008).

O uso indiscriminado de agrotóxicos pode resultar na intoxicação dos trabalhadores rurais. Além disso, pode contaminar alimentos e água, constituindo um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (Meredith 1993; Pires et al. 2005).

Os diferentes tipos de agrotóxicos utilizados na agricultura são classificados de acordo com alvo preferencial (inseticidas, fungicidas e herbicidas); com sua composição química (organoclorados, organofosforado, carbamatos, piretróides etc) e maior e menor toxicidade aguda sobre os seres vivos. Desses compostos, os que apresentam maior grau de toxicidade em mamíferos são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Castro Faria 2003).

Os organofosforados e os carbamatos são muito utilizados como inseticidas e são conhecidos como acetilcolinesterásicos, pois atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase dos mamíferos, se configurando em compostos altamente tóxicos. Esses compostos apresentam semelhanças entre si (efeitos sobre a acetilcolina), porém, os carbamatos agem de forma reversível sobre os organismos, enquanto os efeitos causados pelos organofosforados são permanentes (Castro Faria 2003; Griza et al. 2008).

Os limites permitidos dos organofosforados não foram estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pois são sempre encontrados em concentrações abaixo daquelas em que podem levar a efeitos tóxicos nas águas potáveis. No entanto, em baixas concentrações esse composto pode causar ansiedade, ataxia, confusão mental,

efeitos estes que são facilmente visíveis nos organismos (Veiga et al. 2006; Griza et al. 2008).

Devido aos efeitos negativos causados pela contaminação por diferentes compostos utilizados na agricultura e os riscos causados à população, tornou-se importante à realização de pesquisas que determinem a presença desses compostos nos ambientes naturais, e principalmente, nos recursos hídricos que abastecem os municípios.

O diagnóstico da ocorrência de moléculas de herbicidas foi obtidos, por meio de análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de diferentes grupos químicos (trifluralina, atrazina, simazina, clomazona, acetocloro, ametrina, isoxaflutol, pendimetalina, diurom, tebutiurom, hexazinona, sulfentrazone e glifosato) nas águas e sedimentos do Rio Corumbataí/SP e seus afluentes, servindo de subsídio para a avaliação da qualidade de água desse rio. Os resultados indicaram a presença desses pesticidas em níveis totais elevados, apresentando valores que foram treze vezes maiores do que o limite de potabilidade, sugerindo o risco de toxicidade dessas águas (Armas et al. 2007).

A avaliação do nível de contaminação por pesticidas na água dos principais rios que fluem para o Pantanal Mato-grossense foi feita por meio do método analítico para investigar a presença de pesticidas na água (extração em fase sólida). Os resultados indicaram presença de pesticidas (ditalinfós, sulfato de endosulfan, DDT e dieldrin) na água dos rios, porém, a maioria encontra-se dentro dos padrões permitidos pelo CONAMA. Sugere-se a necessidade de monitoramentos mais detalhados do local tanto nos meios bióticos como nos meios abióticos (Maraschin 2003).

Assim, fica evidente a importância dos estudos com diferentes compostos utilizados na agricultura para avaliar e determinar o potencial dos mesmos em causar possíveis danos no meio ambiente e aos organismos.

4 Monitoramento Biológico

Os biomarcadores (fluidos corpóreos, células, tecidos, e respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos) são utilizados em biomonitoramento para indicar a presença de contaminantes (Livingstone 1998). Os biomarcadores são classificados como de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Os

de exposição são evidenciados por alterações biológicas, que evidenciam a presença de poluentes, os de efeito estão associados à indução do mecanismo de defesa do indivíduo, que se inicia com resposta adaptativa, e os de susceptibilidade estão associados às variações de resposta ao longo do tempo e entre exposição e efeito (Jesus & Carvalho 2008).

A utilização de organismos ou biomarcadores em biomonitoramento para identificação de danos causados por poluentes ambientais tem sido comum nos últimos anos. Estes são capazes de identificar a presença de poluentes atmosféricos, aquáticos ou do solo, mesmo em quantidades abaixo da exigida pelos órgãos reguladores (Ventura et al. 2008; Caritá 2010).

Os organismos proporcionam informações mais consistentes sobre a presença de poluentes do que as avaliações físicas e químicas (Silveira 2007). Devido a este fato, tem sido amplamente discutida nos últimos anos, a inclusão de testes utilizando biomarcadores em monitoramento ambiental, a fim de validar as análises químicas. A escolha do biomarcador varia de acordo com o teste escolhido, a região estudada e o objetivo que se pretende alcançar. Dentre os principais organismos utilizados, estão espécies de moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos, algas e plantas superiores (Cotelle & Ferard 1999).

Pesquisas têm aplicado biomarcadores para biomonitoramento da poluição. Para avaliar o potencial genotóxico da poluição urbana. Em Porto Alegre (RS, Brasil), foi realizado monitoramento *in loco*, durante dois anos, utilizando peixes (*G. trigrina*), plantas (*Tradescantia*), planárias e linhagens de *Samonella*, para determinar os danos causados ao DNA ao longo do tempo. A pesquisa demonstrou a potencialidade dos testes para monitoramento ambiental utilizando biomarcadores (Lau 2002).

Os efeitos mutagênicos (teste de micronúcleo) e as alterações na anatomia e fisiologia da folha de *Tradescantia pallida* foram associados à intensidade do tráfego de veículos em Dourados (MS, Brasil), como forma de demonstrar os efeitos causados pelos poluentes presentes no ar. A pesquisa demonstrou a eficiência da técnica para identificar que alterações ambientais causadas pela poluição atmosférica podem induzir danos ao material genético (Crispim et al. 2012).

Testes com raízes de *A. cepa* e sangue periférico de peixes são utilizados para avaliar a toxicidade, a genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias químicas

presentes nos ambientes. Estes organismos foram considerados bioindicadores eficientes para o biomonitoramento aquático (Bianchi et al. 2011; Liman et al. 2011).

Dessa forma, os bioensaios são adequados para a identificação de efeitos adversos de substâncias sobre organismos vivos, em diferentes concentrações e em diversos tempos de exposição. Diversos testes podem ser utilizados para estudos de monitoramento ambiental, dentre esses destacam-se o teste citotóxico com raízes de *A. cepa*, o teste de micronúcleo e ensaio de cometa utilizando eritrócitos de diferentes espécies animais.

4.1 Teste citotóxico com *Allium cepa*

As plantas superiores são reconhecidas como modelos genéticos para pesquisas de monitoramento ambiental, pois são capazes de detectar efeitos de agentes mutagênicos (Grant 1994; Leme & Marin-Morales 2009). Dentre elas, destaca-se a espécie *A. cepa*, considerada útil para este fim, por apresentar características que permitem avaliar parâmetros macroscópicos (alteração de cor, formato, tamanho da raiz e deformidade) e microscópicos (alterações cromossômicas) (Longhin 2008).

Os primeiros estudos com *A. cepa* foram realizados por Levan (1938). O autor utilizou diferentes concentrações de colchicina para avaliar o índice mitótico nas raízes dessa planta. Fiskesjo (1985) adaptou o referido teste para estudos de monitoramento ambiental, demonstrando a sua adequação tanto pela eficiência como pela rapidez.

O agente mutagênico pode causar mutação de diversas maneiras, dentre elas, na reação direta com o DNA nuclear, a incorporação no DNA durante a replicação; interferência na divisão celular mitótica, acarretando na divisão incorreta das células (Matsumoto et al. 2006; Pedro 2008)

O índice mitótico (IM) analisado em células vegetais é caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular e tem sido utilizado como um parâmetro para avaliar a citotoxicidade de vários agentes. Seus efeitos podem ser medidos pelo aumento e diminuição deste índice (Fernandes et al. 2007).

A biotoxicidade da água que recebe descarga de efluentes industriais foi estudada na cidade de Tucuman na Argentina, por meio de testes biológicos de índice mitótico em *A. cepa*. Todas as amostras analisadas com este organismo-teste indicaram potencial genotóxico e mutagênico para a bacia do Rio Sali na Argentina, comprovando

a eficácia dessas análises. A pesquisa indicou a importância de avaliar efluentes industriais tanto por métodos químicos quanto por testes biológicos, otimizando a política de controle das amostras ambientais (Gana et al. 2008).

A avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de água do Rio Monjolinho (São Carlos/SP), que sofre com influências foram realizadas em diferentes estações do ano utilizando sementes de *A. cepa*. A pesquisa constatou que é possível detectar os efeitos dos contaminantes presentes na água desse rio utilizando esse organismo-teste, pois os poluentes presentes nas amostras levaram a diminuição nos índices de divisão celular (Bianchi et al. 2011).

O estudo de diferentes concentrações do herbicida Atrazina e seus efeitos na divisão celular mostraram que o herbicida induziu alterações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas em células de *A. cepa*, inibindo o índice de divisão celular destes organismos e induzindo alterações cromossômicas, sendo considerado agente mutagênico para os organismos vivos (Ventura et al. 2008).

A avaliação de três contaminantes (Di (2-etilhexil) ftalato; triclosan; propilparabeno) foram realizados em *A. cepa* utilizando testes de alterações cromossômicas, indicaram aumento em relação a essas alterações encontradas para os três compostos, indicando que os bioensaios utilizando raízes de *A. cepa* são ferramentas para determinar o impacto causado por contaminantes (Herrero et al. 2012).

A evidência de que o material genético das células de *A. cepa* superior tende a ser eliminado do núcleo na forma de micronúcleos no citoplasma na presença do herbicida trifluralina foi observado por Fernandes et al. (2007). Os estudos comprovaram que diferentes concentrações do herbicida induz a formação de micronúcleos nas células de *A. cepa*, tanto pela evidência da eliminação do material genético quanto pela presença de células portadoras de micronúcleos.

Os testes utilizando raízes ou bulbos de *A. cepa* são modelos experimentais eficientes para análise da qualidade da água de córregos, rios, efluentes, além de atuarem como organismos-testes para identificar a ação de diferentes compostos mutagênicos (metais e pesticidas) encontrados no meio ambiente.

4.2 Teste de ensaio de cometa

O ensaio de cometa tem sido considerado, nas últimas décadas, como eficiente ferramenta para avaliar os danos causados ao DNA (Leme & Marin-Morales 2009). Rydberg & Johanson (1978) desenvolveram os primeiros estudos de quantificação do dano ao DNA em células individuais, sobre lâminas de microscopia embebidas em agarose e lisadas em condições alcalinas. No entanto, essas condições são diferentes das utilizadas atualmente, pois os danos no DNA eram observados com auxílio de fotômetro, e coloração com laranja de acridina, sendo medida a proporção de fluorescência verde e vermelho que indicavam fita dupla e fica simples de DNA, respectivamente.

Os primeiros trabalhos realizados com eletroforese em micro-gel foram feitos por Ostling & Johanson (1984), A técnica foi aperfeiçoada atribuindo-lhe maior sensibilidade com o uso de solução alcalina (Singh et al. 1988).

Atualmente, células individualizadas são colocadas sobre lâmina de microscopia com agarose, lisadas, submetidas à corrida de eletroforese e coradas com brometo de etídio, ou ainda, mais recentemente com Gel Red. Os nucleóides são analisados em microscópio de fluorescência, sendo que as células sem DNA danificado apresentam nucleóide redondo, enquanto o DNA resultante de quebras simples ou múltiplas migra para fora do nucleóide, formando uma cauda, similar a um cometa. O dano ocorrido está relacionado com a extensão da cauda do DNA que migrar para fora do nucleóide (Fairbairn et al. 1995).

A medida utilizada na avaliação do dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das caudas formadas pelo DNA em migração (classificados como classe 0: sem dano, classe 1: ligeiramente danificado, classe 2: danificado, classe 3 e 4 altamente danificado) (Ferraro 2009).

Os danos no DNA causados por agentes mutagênicos presentes em ambientes aquáticos foram analisados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos á água do rio Paraíba do Sul, recurso hídrico que recebe influência de refinaria de petróleo. A intensidade dos danos causados por agentes mutagênicos nas células desses peixes foi avaliada e, conseqüente, estimativa da qualidade de água destinada a população e os perigos dessa água para a biota aquática (Souza 2007).

A necessidade de aumento de produtividade agrícola tem contribuído para a utilização de pesticidas nas lavouras. Estes são compostos químicos capazes de causar danos às células e pela sua acumulação nos organismos vivos causam riscos de toxicidade, mutagenicidade, carcinogênese e teratogênese. A aplicação do ensaio de cometa para avaliar os danos causados por diferentes concentrações do herbicida utilizados na agricultura foi realizado por testes com células de *O. niloticus*, demonstrando a sensibilidade e eficiência desses organismos para a determinação de danos no DNA, causado por poluentes ambientais (Ventura 2004).

Os danos genotóxicos causados em eritrócitos de *Hoplias malabaricus* por compostos presentes em efluentes industriais foram avaliados por meio do teste de cometa. O estudo testou as concentrações do metilmercúrio em efluentes industriais, utilizando indivíduos que ficavam em exposição a estes agentes por 24 horas. Os resultados indicaram que em todas as concentrações e períodos de exposição, os efluentes induziram danos no material genético dos tipos celulares avaliados, comprovando a eficácia do teste para análise de efluentes industriais (Vicari 2009).

O ensaio de cometa é, portanto, eficiente para diferentes avaliações ambientais, sendo ferramenta básica em diversas áreas de pesquisa, como genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA, ecotoxicologia genética e biomonitoramento ambiental (Gontijo & Tice 2003)

4.3 Teste de Micronúcleo

Micronúcleos são massas de cromatina com aparência de pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos da célula em anáfase (Schmid 1976; Al-Sabti & Metcalfe 1995).

O dano causado por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos), induz a formação de micronúcleo, determinando alterações mutagênicas nos cromossomos e danos ao fuso mitótico (Silva et al. 2011). Estes agentes podem induzir alterações clastogênicas (quebras cromossômicas) ou aneugênicas (aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (Fenech 2000).

O teste do micronúcleo (MN) foi desenvolvido por Boller & Schmid (1970) em eritrócitos de medula óssea e sangue de hamsters. É um ensaio utilizado para a detecção de agentes químicos que podem induzir danos ao material genético (Hayashi et al. 1994).

O teste de micronúcleo para verificação de alterações cromossômicas em substituição às técnicas citogenéticas convencionais apresenta vantagem pelo fato de ser técnica rápida e barata (Heddle 1973). Entretanto, apesar da metodologia do teste ser simples é importante a utilização de protocolos padronizados quanto ao tratamento dos animais, coleta e processamento das células (Flores & Yamaguchi 2008).

Os estudos utilizando eritrócitos de peixes começaram com Hooftman & Raat (1982) que sugerem o uso do teste como alternativa à análise de alterações cromossômicas. Os eritrócitos de peixes são preferidos para o teste, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados, como resultado de atividade clastogênica (Al-sabti & Metcalfe 1995).

A diferença significativa da resposta a agrotóxicos foi analisada por meio do teste de micronúcleo píceo com espécies do gênero *Astyanax* expostas, tanto em ambiente natural (Fazenda Cangüiri e Parque Costa – Curitiba/PR) como em bioensaio com sulfato de cobre. Seus dados mostraram que houve sensibilidade dos organismos testados ao agente xenobiótico, apresentando frequências significativas de micronúcleos, demonstrando que o teste é eficiente para determinar esses fatores mutagênicos (Ramsdorf et al. 2009).

A utilização de eritrócitos de *O. Niloticus* em testes de micronúcleo para avaliar a mutagenicidade causada por extratos de cianobactérias mostrou ser eficiente para determinar o potencial mutagênico de diferentes concentrações desse composto. Os dados mostraram altos índices de micronúcleos causados por esse extrato que foram visíveis nas células da espécie utilizada, confirmando sua susceptibilidade para esse tipo de análise (Silva et al. 2011).

O aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de peixes, após exposição a diferentes contaminantes, tanto em condições de bioensaio quanto em condições naturais indicaram o grau de dano causado ao organismo, que pode ser usado como indicador de qualidade ambiental (Galvan 2011).

A mutação é uma consequência do dano no DNA que pode estar relacionado à estágio inicial da formação de tumores, provenientes da ação de agentes carcinogênicos

químicos, comuns em efluentes domésticos, industriais e agrícolas (Pedro 2008; Ventura 2008). Com isso, há necessidade de avaliar a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes compostos químicos presentes nos ecossistemas, através de biomarcadores (vegetais e animais), pois estes permitem identificar os efeitos causados nos organismos vivos decorrentes da ação de tóxicos.

5 Referências Bibliográficas

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

Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Stjean S, Couternay SC, Lima E, Wagner ALR, Scofield A, Oliveira Ribeiro CA (2004) Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil, Arch Environ Contam Toxicol 46:244–253.

Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, Mutat Res, 343:121–135.

Armas ED, Monteiro RTR, Antunes PM, Santos MAPF, Camargo PB (2007) Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes, Quim Nova 30:1119-1127.

Barros M, Silva M, Sosa R (2005) Agência ambiental **Geo-Goias**: <http://www.agenciaambiental.go.gov.br/geogoiias>.

Biagini FR, David JAO, Fontanetti CS (2009) The use of histological and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters, Micron 40:839-844.

Bianchi J, Espindola ELG, Marin-Morales MA (2011) Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. Ecotox Environ Saf 74:826-833.

Boller K, Schmid W (1970) Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als *in vivo*-Test system. Humangenetik 2:35-54.

Braguini WL (2005) Efeitos da Deltametrina e do Glifosato, sobre Parâmetros do Metabolismo Energético Mitocondrial, sobre Membranas Artificiais e Naturais em

Experimentos “in vivo”, Tese, Doutorado em Ciências Bioquímicas, Universidade Federal do Paraná.

Buss DF, Baptista DF, Nessimian JL (2003) Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade de água de rios. Cad Saúde Pública 19:465-473.

Campanha de Tecnologia e Saneamento Ambiental (2012) Relatório de qualidade das águas interiores de São Paulo 312p.

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

Castro Faria MV (2003) Avaliação de ambientes e produtos contaminados por agrotóxicos - É veneno ou remédio? Editora Fiocruz 177-209.

Castro SV (2006) Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do Alto Rio das Velhas-MG, Dissertação, Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais.

Christofolletti CA, Pedro-Escher J, Fontanetti CS (2013) Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay, Water Air Soil Pollut 224-1523.

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB (2010) Variáveis de qualidade das águas.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2005) Resolução nº 357, 17 de Março de 2005 27p.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2008) Resolução nº 396, 3 de Abril de 2011 11p.

Costa RMA, Menk CFM (2012) Biomonitoramento de mutagênese ambiental. Biotec Ciência Desenvol 24-26.

Cotelle S, Ferard JF (1999) Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review, Environ Molec Mutag, 34:246-255.

Crispim BM, Vaini JO, Grisolia AB, Teixeira TZ, Mussury RM, Seno LO (2012) Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R Hunt in Dourados, Brazil, Environ Sci Pollut Res 19:718-723.

Dearfield KL, Cimino MC, Mccarroll NE, Mauer I, Valcovic LR (2002) Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. Mutat Res 521:121-135.

Dias NMFS (2004) Minamata Case Study, Ambicare Industrial, Portugal.

Egito LCM, Medeiros MG, Batistuzzo de Medeiros SR, Agnez-Lima LF (2007) Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. Genet Mol Biol 30:435-431.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res 339:37-59.

Farias MSS, Neto JD, Lima VLA, Lira VM, Franco ES (2007) Riscos Sociais e Ambientais devido a presença de metais pesados nas águas superficiais no distrito industrial de Mangabeira, Qualita Revista Eletrônica.

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 455:81-95.

Fernandes TCC, Mazzeo DE, Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Scien Direc* 88: 252-259.

Ferraro MVM (2003) Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas. Tese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

Ferreira AP (2009) Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, água e em *Leucopternis lacernulata* (gavião-pomba). Estudo de caso: Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, *Gaia Scientia* 3: 23-31.

Fiskesjö G (1983) Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*.

Fiskesjo G (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102:99-112.

Flores M, Yamaguchi MU (2008) Teste do micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. *Rev Saúde Pesq* 1:337-340.

Fusconi A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumas-Gaudot E, Berta G (2006) Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Env Exp Bot* 58: 253-260.

Galvan GL (2011) Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae). Dissertação, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

Gana JM, Ordóñez R, Zampini C, Hidalgo M, Meoni S, Isla MI (2008) Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. *J Hazard Mater* 155:402-406.

Gontijo AMMC, Tice R (2003) Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *Mutat Amb* 173-200.

Grant WF (1994) The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. *Mutat Res* 310:175–185.

Griza FT, Ortiz KS, Geremias D (2008) Avaliação da contaminação por organofosforado em águas superficiais no Município de Rondinha – Rio Grande do Sul, *Quim Nova* 31:1631-1635.

Guerra RC (2009) Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. visando sua disposição final. Tese, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Hayashi M, Macgregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou S (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 312:293–304.

Heath AG (1995) *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, 2:42p.

Heddle JA (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18:187-90.

Herrero O, Pérez Martin JM, Fernández Freire P, Carvajal Lopes L, Peropadre A, Hazen MJ (2012) Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat Res* 743:20-24.

Hooftman RN, Raat WK (1982) Induction of nuclear anomalies micronuclei in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methane sulphonate. *Mutat. Res* 104:147–152.

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

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

Isensee AR (1991) Movement of herbicides in terrestrial and aquatic environments, CRC Press 1:651-659.

Jesus TB, Carvalho CEV (2008) Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação da contaminação ambiental por mercúrio (Hg). Oecol Bras 12:680-693.

Kruger RA (2009) Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*, Dissertação, Programa de pós-graduação em Qualidade Ambiental, Centro Universitário Feevale.

Lau AH (2002) Avaliação múltipla do potencial genotóxico da poluição urbana de Porto Alegre – RS. Tese, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Leffa DD, Andrade VM (2008) Potencial genotóxico de metais em áreas mineradas de carvão. Rev Pesq Ext Saude 4:141-146.

Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutat Res 682:71-81.

Levan A (1938) The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. Hereditas 24:471-486.

Liman R, Cigerci IH, Akyil D, Eren Y, Konuk M (2011) Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium cepa* and Cometa Assay. Pestic Biochem Physiol 99:61-64.

Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physio* 120:43-49.

Longhin SR (2008) Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos, Tese, Instituto de Química, Universidade de Brasília.

Maraschin L (2003) Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-grossense, Dissertação, Instituto de saúde coletiva, Universidade Federal do Mato Grosso.

Marcano L, Carruyo I, Fernandez Y, Montiel X, Torrealba Z (2006) Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. *Biocell* 30: 259-267.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MI, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA (2006) Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in *Allium cepa*. *Genet. Mol. Biol* 29:148-158.

Meredith TJ (1993) Epidemiology of poisoning, *Pharmacol Ther* 59:252-256.

Oliveira CPF (2003) Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tabaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.

Östling O, Johanson KL (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Bioch Biophys Res Commun* 123:291-298.

Papagiannis I, Kagalou I, Leonardos J, Petridis D, Kalfakakou V (2003) Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece), *Env Inter* 30:357-362.

Patra J, Baisakhi B, Mohapatro MK, Panda BB (2000) Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and theyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in plant cells in vivo. *Mutat Res* 465:1-9.

Pedro J (2008) Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa*. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Peron AP, Canesin EA, Cardoso CMV (2009) Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. *Revista Bras Biocien* 7: 155-159.

Pires DX, Caldas ED, Recena MCP (2005) Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública* 21:598-605.

Ramsdorf WA, Ferraro MVM, Oliveira-Ribeiro CA, Cestari MM (2009) Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplais malabaricus*. *Environ Monit Assess* 158:77-85.

Ritter WF (1990) Pesticide contamination of ground water in the United States: a review. *J. Environ. Sci. Health*, 25:1-29.

Rydberg B, Johanson KJ (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds): DNA repair mechanisms. Academic Press 465–468.

Sampaio ACS (2003) Metais pesados na água e sedimentos dos rios da Bacia do Alto do Paraguai, Dissertação, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Schmid W (1976) The micronucleus test for cytogenetics analysis. *Mutat Res* 31:9-15

Silva J, Heuser V, Andrade V (2003) Biomonitoramento Ambiental. *Genet Toxicol* 167-170.

Silveira RM (2007) Biensaio de toxicidade e organismos bioindicadores como instrumento para a caracterização ambiental do rio Itajaí-Mirim, SC. Dissertação, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Vale do Itajaí.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.

Souza RA (2007) Avaliação de metais em águas da sub-bacia hidrográfica do rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul. Dissertação, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Souza VM (2010) Bioindicadores animais de metais poluentes. Dissertação, Instituto de Ecologia, Universidade Católica de Goiás.

Veiga MM, Silva DM, Veiga LBE, Faria MVC (2006) Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste Brasileiro. *Cad Saude Publica* 22:2301-2399.

Ventura BC (2004) Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Ventura BC, Angelis DF, Marin-Morales MA (2008) Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (*Perciformes cichlidae*) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic Biochem Physiol* 90: 42-51.

Vicari T (2009) Avaliação do efeito mutagênico de duas concentrações (0,075µg/g e 0,75 µg/g) do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (PISCES) através do ensaio de cometa e micronúcleo. Dissertação, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CAPÍTULO II

BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO CÓRREGO ÁGUA BOA (DOURADOS, MS)

BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO CÓRREGO ÁGUA BOA (DOURADOS, MS)

Priscila Leocádia Rosa Dourado, Alexeia Barufatti Grisolia

P.L.R. Dourado; A.B.Grisolia

Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias

Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil

e-mail: Priscila_dourado_259@hotmail.com

RESUMO

O córrego Água Boa (Dourados, MS) percorre áreas urbanas e agrícolas, recebe efluentes do distrito industrial da região de Dourados e deságua no Rio Dourados. O objetivo do estudo foi identificar compostos químicos e avaliar danos no material genético de células animais e vegetais submetidas a bioensaios com água proveniente deste córrego, a fim de gerar subsídios que auxiliem planos de gestão de qualidade de água. As amostras de água foram coletadas no período de Dezembro 2012 a Outubro 2013 em três pontos que se diferenciam em P1 (jusante da zona urbana), P2 (jusante do aterro sanitário e distrito industrial) e P3 (foz do Rio Dourados). Os parâmetros químicos referentes à quantidade de metais e pesticidas e biológicos, por meio de bioensaios utilizando organismos (teste de citotoxicidade, micronúcleo písceo e ensaio de cometa) foram avaliados. Os bioensaios de citotoxicidade foram realizados com sementes de *Allium cepa* colocadas sob germinação. Os testes de micronúcleo písceo e ensaio de cometa foram utilizados exemplares de *Astyanax altiparanae*, mantidos por 72 horas em aquários contendo amostras de água dos pontos de biomonitoramento. As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste ANOVA e quando significativo teste de Tukey ($p < 0,05$), além do teste de Qui-Quadrado. As análises químicas revelaram existência de metais (Cu, Cd, Pb e Ni) acima dos parâmetros permitidos pela legislação e presença de pesticida (Thiamethoxan) na água nesses locais. A frequência de micronúcleo, ensaio de cometa e bioensaios com *Allium cepa* indicaram diferença significativa entre as amostras coletadas nos diferentes períodos. As amostras coletadas nos diferentes pontos de coleta indicaram maiores interferências antrópicas para as localidades após o descarte de resíduos industriais (P2 e P3). O estudo demonstrou que

os biotestes utilizados indicaram danos genéticos nas células animais e vegetais, possivelmente relacionados à presença de contaminantes. Essa pesquisa possibilitará o incremento de ferramenta adicional para gerir o monitoramento da qualidade da água de rios e córregos da região de Dourados, MS.

Palavras-chave: mutagenicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, testes citogenéticos, monitoramento ambiental,

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento econômico na década de 50 acarretou em ocupação territorial e industrial que invadiu áreas de proteção ambiental, contaminando os corpos de água, que passaram a receber grande parte dos efluentes domésticos e industriais. Além disso, nas áreas de desenvolvimento agrícola, defensivos e insumos químicos podem contaminar córregos e rios que se encontram próximos a essas localidades (Araújo 2006).

A perda da qualidade da água e da biodiversidade aquática tem sido intensa devido a exploração oriunda de atividades antrópicas como: uso inadequado do solo, descarga de efluentes, a exploração da pesca predatória, causando alteração no ambiente aquático e implicando na perda da biodiversidade (Goulart & Callisto 2003).

A política normativa nacional que determina o uso da água no Brasil para garantir a qualidade da água dos ecossistemas aquáticos é regulamentada pela resolução número 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente do ano de 2005 que visa firmar parâmetros para definir limites aceitáveis de compostos estranhos em diferentes usos, utilizando-se de parâmetros que permitam avaliar as condições físicas, químicas e biológicas da água (Caritá 2010).

Pesquisas com bioindicadores são realizadas para identificar a presença de substâncias químicas lançadas no ambiente, que além de serem causadoras de alterações gênicas e cromossômicas estão relacionadas a efeitos diretos na saúde, podendo induzir doenças humanas, como câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (Rádic 2010).

Biotestes com microrganismos, células vegetais e de mamíferos isoladamente ou em combinação com análises químicas têm sido empregados para definir as condições de toxicidade da água dos recursos hídricos (Zegura et al 2009).

Estudos realizados na Bacia do Rio Dourados (Dourados, MS) indicaram que atividades econômicas como abatedouros, laticínios, curtumes e aviculturas geram efluentes que podem contaminar os recursos hídricos locais (Souza 2007; Campos et. al 2010). Dentre os córregos existentes nesse município destaca-se o Água Boa, que recebe efluentes de esgoto doméstico, lixo urbano, descarte de resíduos industriais,

pesticidas (neocotinóides, carbamatos, organofosforado e piretróides) e insumos agrícolas.

O uso de biotestes para monitoramento ambiental do Córrego Água Boa pode ser utilizado para identificar os possíveis danos genéticos causados nos seres vivos provenientes da presença de poluentes (urbanos, industriais e agrícolas), que são depositados no córrego, muitas vezes, sem tratamento necessário ou devido ocupações irregulares que contribuem para o aumento da poluição.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar danos no material genético de células animais e vegetais submetidas a bioensaios com água proveniente do córrego e identificar compostos químicos presentes nesse ambiente, com a finalidade, de gerar informações referentes à qualidade da água nos ambientes aquáticos naturais na região de Dourados/Mato Grosso do Sul (Córrego Água Boa), auxiliando em controle de qualidade de água de córregos e lagos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do local de biomonitoramento

As amostras de água foram coletadas no córrego Água Boa pertencente à bacia do Rio Dourados na região da Grande Dourados no Estado de Mato Grosso do Sul. As coletas foram realizadas em dezembro/2012, fevereiro/2013, abril/2013, julho/2013, setembro/2013 e outubro/2013 totalizando seis coletas em quatro locais distintos. O ponto 1 (P1) (S 22.31060° W 054.79087) localiza-se a jusante da zona urbana, o ponto 2 (P2) (S 22.32965° W 054.79107°) a jusante do aterro sanitário e do distrito industrial, ponto 3 (P3) (S 22.39558° W 054.78407°) próximo à foz do Rio Dourados e o P4 (S 22.19697° W 054.934458°) no poço de água subterrânea da Universidade Federal da Grande Dourados (Figura 1). A localização dos pontos de coleta foi realizada por meio do GPS (*Global Positioning System* - Sistema de Posicionamento Global).

O P1 do córrego (local com interferência antrópica devido à proximidade com área urbana e distrito industrial) apresentava em seu leito água de aspecto sujo (possivelmente devido ao solo argiloso) e de odor forte, além da presença de gordura e espuma não natural nas margens do córrego, O leito do córrego dos P2 e P3 apresentavam água de coloração escura e presença de espumas não naturais dispersas na água (Figura 2).

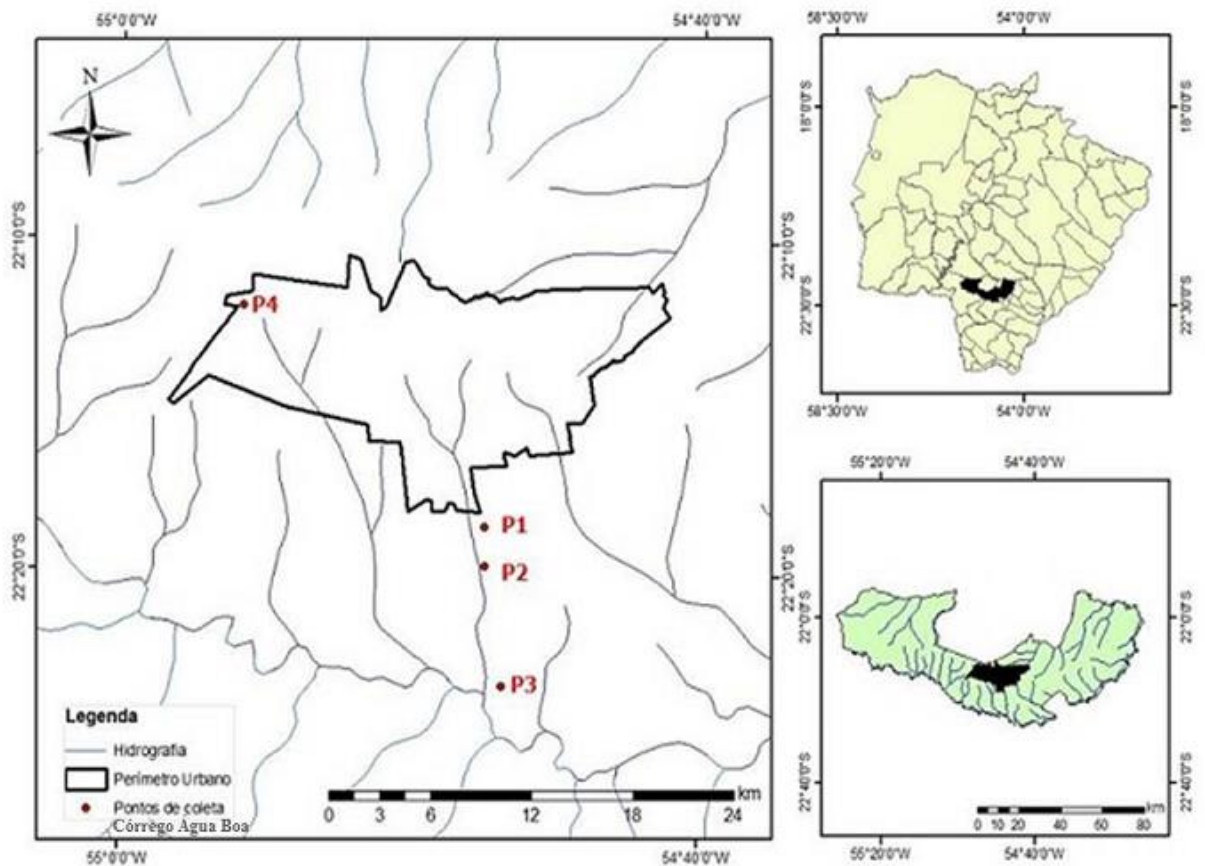


Figura 1: Mapa dos pontos de coleta no córrego Água Boa (P1, P2, P3) e Poço Artesiano da UFGD (P4) na cidade de Dourados/MS.



Figura 2 Apecto visual do local de coleta (P1, P2 e P3) do córrego Água Boa (Dourados, MS).

As condições físico-química da água do Córrego Água Boa e dados pluviométricos foram mensurados para obtenção das características ambientais.

Os parâmetros referentes à temperatura da água (°C), pH; oxigênio dissolvido (OD (mg L⁻¹ O₂); condutividade elétrica (Cond (uS/cm²) e os sólidos totais dissolvidos (TDS (mg L⁻¹) foram mensurados nos pontos de coleta, por meio de sonda multiparâmetro HI 9829 da marca Hanna. Os dados pluviométricos de Dourados (MS) foram baseados em mensurações meteorológicas realizadas pela Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados, MS.

2.2 Coleta de água

As coletas das amostras de água nos pontos P1, P2 e P3 no córrego Água Boa (superficial) foram realizadas no mesmo dia da semana (Segunda-feira) e em horários similares. Também foi coletada água de poço artesiano (subterrânea) do tanque de abastecimento da Universidade Federal da Grande Dourados (P4 - controle). As amostras para os bioensaios com os peixes (lambaris) foram coletadas em galões de 20 litros em cada ponto. As amostras de água para os testes com *Allium cepa* foram coletadas em frascos de polietileno de 250 mL. Os galões ou frascos foram previamente higienizados antes das coletas.

As amostras de água destinadas às análises químicas (metais e pesticidas) foram coletadas em frasco âmbar de 1L e refrigeradas até o momento de análise. Para a determinação de metais, acidificou-se a água com ácido nítrico.

2.3 Análises Químicas

2.3.1 Determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn

O preparo das soluções para análise dos metais presentes nas amostras de água foi feito com água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida a partir de deionizador *Millipore Milli-Q Academic* (Beadford[®], EUA).

A determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foi feita utilizando espectrômetro de absorção atômica em chama AA 240FS (*Agilent Technologies*[®], EUA) equipado com lâmpadas de cátodo oco (LCO) monoelementares. As medidas de

absorbância foram feitas utilizando as linhas analíticas de Cu (324,7 nm), Fe (248,3 nm), Mn (279,4 nm), Zn (213,8 nm), Cd (222,8 nm), Co (240,7 nm), Cr (357,9 nm), Ni (232,0 nm) e Pb (217,0 nm). As soluções foram aspiradas para o interior do sistema nebulizador/queimador e os elementos foram atomizados com taxa de aspiração fixada em $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Todas as medidas foram feitas com três repetições.

Soluções estoque de 5,0% (m/v) de lantânio (La) foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 58,6 g La_2O_3 99,9% (m/m) (Vetec[®], Brasil) em 120 mL de HCl concentrado e diluindo a 1000 mL com água deionizada.

As soluções de calibração multielementares foram preparadas a cada rotina de trabalho, por meio de diluição apropriada das soluções estoques monoelementares (1000 mg L^{-1} , SpecSol[®], Brasil), nos intervalos $0,0 - 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ Zn; $0,0 - 4,0 \text{ mg L}^{-1}$ Mn; $0,0 - 10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Co e Ni; $0,0 - 15,0 \text{ mg L}^{-1}$ Cr e Pb em meio de 1,0% (m/v) La e 1,0% (v/v) de HNO_3 .

Para o procedimento de preparo de amostra, foram transferidos 200 mL de água para um erlenmeyer, e adicionados 10 mL de HNO_3 37% (v/v) (Vetec[®], Brasil). A mistura contendo amostra e reagentes foi levada para chapa de aquecimento a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, para a etapa de pré-concentração da solução amostra. O volume foi reduzido até, aproximadamente, 30,0 mL e ajustado a 50,0 mL em balão volumétrico com água ultrapura.

A descontaminação dos materiais utilizados no preparo das soluções foi feita, inicialmente, com água corrente e posteriormente imersos em banho contendo solução a 10% (v/v) de HNO_3 por 24 horas. Em seguida os materiais foram enxaguados com água deionizada.

Os principais parâmetros de confiabilidade analítica, como limite de detecção e de quantificação, foram calculados pelo método da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), empregando os programas como Microsoft Excel[®] e Microcal OriginPro[®], como ferramenta de cálculo.

2.3.2 Determinação de compostos orgânicos

Extração dos constituintes

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e 200 mL de cada amostra sofreu o processo de extração de fase sólida (SPE). O processo consistiu em: ativação do cartucho com 20 mL de metanol para abertura das cadeias poliméricas; acondicionamento dos cartuchos com 20 mL de água ultrapura; inserção de 200 mL de amostra; eluição com 20 mL de metanol e, posteriormente, com 20 mL de acetato de etila. As frações metanólica e de acetato de etila de cada amostra foram unidas e evaporadas. Posteriormente foram rediluídas em 100 µL de metanol, passaram por membrana de 0,20 µm e foram analisadas por HPLC em no máximo dois dias após o preparo, sendo que neste período foram armazenadas à -5 °C.

Condições cromatográficas

Considerando-se que dentre os pesticidas neonicotinoides e os fungicidas benzimidazóis, utilizados nas áreas agrícolas da região de Dourados, destacam-se o Thiametoxan e Carbendazim, respectivamente. Dessa forma, foram realizadas análises para pesticidas thiamethoxam, carbendazim em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), modelo LC-6AD, sistema binário, detector espectrofotométrico (UV-VIS) com comprimentos de onda entre 200 a 800 nm, coluna Cromatográfica com fase estacionária C18 Phenomenex Gemini (25cm x 4,6mm x 5 µm) e pré-coluna de mesma fase.

Determinação analítica dos compostos

Os limites de detecção foram determinados por injeções de 20 µL (n = 5) de solução conhecida dos compostos e, em seguida, diminuindo as concentrações até a detecção de um pico com relação sinal/ruído de três. A concentração correspondente das amostras foi considerada como sendo a concentração mínima detectável. Os limites de quantificação foram determinados, empregando-se a mesma metodologia, porém foi considerado o pico cromatográfico com relação sinal/ruído de dez.

A estimativa do conteúdo dos compostos orgânicos nas amostras foi realizada por calibração externa. As soluções empregadas na curva analítica foram preparadas

empregando as soluções de trabalho diluídas em metanol grau cromatográfico, resultando em diferentes concentrações. Aliquotas de 20 µL foram analisadas por HPLC, em cinco repetições. Uma regressão linear de mínimos quadrados das áreas dos picos, em função das concentrações, foi realizada para determinar os coeficientes de correlação. Os parâmetros da equação (inclinação e intercepção) de cada curva padrão foram utilizados para obter os valores de concentração para as amostras. As amostras com concentração superior as derivadas para a curva analítica da curva analítica foram testadas, novamente após a diluição adequada.

2.4 Análises Biológicas

2.4.1 Biotestes Vegetais

Para os testes com sementes de *A. cepa* foram preparadas cinco placas de petri com 50 sementes (*A. cepa* variação Baía Periforme). Três placas foram utilizadas para os ensaios com amostras de água do córrego Água Boa (P1, P2 e P3) e as outras duas destinadas à água do tanque da UFGD (P4 - controle) e ao controle positivo (CP) o agrotóxico Volcane® (190 µL/ 100mL).

As sementes expostas aos tratamentos por 96 horas, foram coletadas com, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento das raízes. Os meristemas apicais de cada semente foram fixados em Carnoy 3:1 (v/v) etanol/ácido acético glacial por 6 horas. Em seguida as raízes foram hidrolizadas com HCL 1N a 60 °C por 10 minutos, lavadas com água destilada e coradas com Reativo de Schiff por 2 horas.

Para cada tratamento, foram preparadas 5 lâminas, contendo uma radícula por lâmina e contadas em microscópio de luz Nikon, no aumento de 400x. De cada lâmina contou-se 1000 células, totalizando, assim, 5000 células por tratamento. O índice mitótico (IM) e o índice de alteração cromossômica (IA) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo descritas. As alterações mais representativas foram fotografadas com câmera Sony H-50

$$\mathbf{IM} = \text{número de células em divisão} / \text{número de total de células contadas} \times 100$$

IA = número de células com alteração / número de total de células em divisão contadas x100

2.4.2 Biotestes Animais

As amostras de água oriundas dos pontos P1, P2, P3 (córrego Água Boa) e do P4 (água subterrânea da UFGD) foram colocadas em aquários de vidro (40 x 30 x 20 cm) devidamente aerados, à temperatura ambiente, durante um período de 24h.

Os peixes (*Astyanax altiparanae*) utilizados para o bioensaio foram fornecidos pela Piscicultura Douradense (Dourados/MS), transportados da Piscicultura até o Laboratório em galões de água aerados e colocados nos aquários, primeiramente preparados com as amostras de água. Esses peixes permaneceram em condições experimentais por 72 horas.

Dez peixes (tamanho aproximado de 8 cm) foram aclimatados em cada aquário, sendo que 5 destes foram utilizados para o teste de micronúcleo písceo e os demais para o ensaio de cometa.

Teste de Micronúcleo Písceo em *A. altiparanae*

Os espécimes de *A. altiparanae* foram coletados após 72 horas de exposição e anestesiados com Benzocaína 2% v/v (solúvel). Em seguida, os animais foram sacrificados e com tesoura realizou-se o corte na nadadeira caudal para coleta de sangue destinado ao esfregaço, para contagem de eritrócitos.

A contagem de micronúcleos seguiu o protocolo descrito por Schmid (1975) e Heddle (1983) com algumas adaptações. O sangue coletado na região caudal (0,1 mL) foi colocado na superfície da lâmina (limpas e identificadas) e, com auxílio de outra lâmina, foi realizada uma extensão sanguínea. Após secagem ao ar, as lâminas foram fixadas, por 10 minutos, em etanol. De cada peixe foram feitas duas extensões sanguíneas.

As lâminas foram coradas com coloração rápida para hematologia (Panótico Rápido LB) seguindo o protocolo do fabricante. A contagem dos micronúcleos foi realizada com auxílio de microscópio óptico Nikon (400X). De cada peixe foram contadas, com auxílio de um contador manual, 2.000 células. Somente as hemácias com membrana celular e citoplasmática intactas foram consideradas para as análises.

Ensaio do cometa em *A. altiparanae*

O teste de cometa em *A. altiparanae* foi adaptado da metodologia proposta por Ventura (2004). O sangue do peixe foi coletado por punção branquial e 6 µL diluído em 2000 µL de solução salina (PBS). Duas lâminas foram confeccionadas para cada peixe e montadas com 20 µL de suspensão celular e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % (v/v) a 37 °C. As lâminas permaneceram em solução de lise, à 4 °C, por 1 hora. Após a lise, as lâminas foram armazenadas em tampão NaOH 0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ (pH>13) por 20 minutos para desnaturação do DNA, sendo submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos. As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹) e 100 nucleóides de cada uma delas foram observados em microscópio de fluorescência da marca Labomed (modelo T121100), equipado com filtro de B-3^A (excitação $\lambda = 350 - 580$ nm, emissão de barreira $\lambda = 680$ nm) na objetiva de 40x.

Os nucleóides foram classificados de acordo com o tamanho da “cauda” em Classe 0 (nenhum dano ou seja, nucleóides intactos, sem cauda), classe 1 (ligeiramente danificado, os nucleóides apresentam um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça), classe 2 (dano intermediário, os nucleóides apresentam caudas com tamanhos equivalentes a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça), classe 3 (dano elevado, os nucleóides apresentam caudas com tamanho equivalente a duas vezes o diâmetro da cabeça e 4 (dano máximo, os nucleóides apresentaram caudas com tamanho superior a três vezes o diâmetro da cabeça altamente danificado) (Figura 3). As lâminas foram codificadas e sempre analisadas pela mesma pessoa. O índice de células com cometa foi determinado pelo cálculo do número de células com cometa multiplicado pela classe

correspondente (0, 1, 2, 3 e 4). As células foram classificadas de acordo com o observado na Figura 3.



Figura 3 Classes de danos de DNA observadas no ensaio cometa de eritrócitos das brânquias de *A. altiparanae*.

Os procedimentos para realização da experimentação animal foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFGD, Protocolo nº. **005/2013**.

2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos do número médio de micronúcleo (MCN), índice mitótico (IM) e de anormalidades cromossômicas (IA) foram submetidos ao teste estatístico Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resultados. As médias foram transformadas ($\sqrt{x} + 0,5$) visando atender os pressupostos da análise de variância (normalidade de erros), entretanto, as médias originais foram mantidas para apresentação. Após a verificação da normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos a análise de variâncias pelo teste ANOVA e quando significativo comparou-se as médias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Para análise dos resultados do teste de ensaio de cometa foi calculado o total de células com cometas (classes 1, 2, 3, 4) para os 100 nucleóides analisados. O total de células com alteração de cada tratamento foi submetido ao teste estatístico Qui-Quadrado, para comparação dos resultados dos tratamentos com o controle negativo. Os resultados estatísticos foram analisados com auxílio dos programas SAS® (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) e BioEstat 4.0 (Ayres et al. 2005).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização do ambiente

A água proveniente do córrego Água Boa mesmo permanecendo durante 24 horas no aquário, anterior à realização do bioensaio animal, apresentava odor desagradável. Os peixes que foram colocados nos aquários com amostras de água provenientes dos P1, P2 e P3 demonstravam dificuldade de respiração, apresentando aumento da movimentação branquial, quando comparados ao do controle – P4

Os resultados referentes às análises físico-químicas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios das análises físico-química de amostras de água dos pontos de coleta (P1, P2 e P3) do córrego Água Boa e água subterrânea do poço da UFGD (P4).

Parâmetros	Pontos de Coleta				Parâmetros Conama*
	P1	P2	P3	P4	
Temperatura da Água (°C)	20,7	22,7	23,0	25,1	Inferior a 40°C
pH	8,0	7,9	7,6	7,8	6,0 a 9,0
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	27,4	17,8	22,7	11,3	Não inferior a 4 mg L ⁻¹
Condutividade (uS/cm ²)	212,0	279,0	272,0	130,0	inferior à 100 uS/cm ²
Sólidos Totais Dissolvidos- TDS (mg L ⁻¹)	109,0	141,0	137,0	63,4	500 mg L ⁻¹

*Resolução nº357 de 2005 do Conama

As amostras do Córrego Água Boa, apresentaram valores dentro limites estabelecidos pelo CONAMA (357/2005) para todos os pontos amostrados, exceto para os valores referentes à condutividade elétrica que apresentaram índices acima do permitido (maior que 100 uS/cm - CONAMA²), para os três pontos de coleta no córrego Água Boa, indicando a presença de sais nesses locais (Tabela 1).

Os dados pluviométricos da cidade de Dourados durante os períodos amostrados foram baseados no banco de dados meteorológicos pela Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados/MS (Tabela 2)

Tabela 2 Dados de pluviosidade do município de Dourados (MS) nos períodos de coleta.

Período de Coleta	Dezembro	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro	Outubro
	2012	2013	2013	2013	2013	2013
Precipitação (mm)	3,62	3,82	9,59	4,31	1,69	4,23

A precipitação média entre coletas (intervalo de 60 dias aproximadamente) permitiu destacar que o período de Abril 2013 apresentou maiores valores de precipitação pluviométrica.

3.1 Determinação de Metais

Os resultados referentes à determinação de metais estão representados na Tabela 3.

Por meio da determinação de metais foi observado que os valores encontrados para o Cu nas amostras de água do córrego Água Boa foram maiores que o permitido nas coletas realizadas em setembro e outubro de 2013 para todos os pontos (P1, P2 e P3). Entretanto, na coleta de abril de 2013, apenas os P1 e P2 apresentaram valores acima do permitido.

Os valores para o Cd foram superiores ao permitido nos P2 (abril), P3 (julho) e P1 (setembro). Enquanto que para o Chumbo, os valores foram superiores para o P1 nas coletas de abril e julho de 2013; para o P2 em outubro; e para P3 em setembro e outubro de 2013. Dentre os metais que estavam acima da legislação, o Níquel foi o que

apresentou os maiores valores em todos os pontos de coleta, exceto para o P2 em abril de 2013.

A determinação de metais indicou que valores encontrados para o Cobre nas amostras de água do córrego Água Boa foram maiores que o permitido nas coletas realizadas em setembro e outubro de 2013 em todos os pontos (P1, P2 e P3). Entretanto, na coleta de abril de 2013, apenas os P1 e P2 apresentaram valores acima do permitido.

Os valores para o Cádmio foram superiores ao permitido nos P2 (abril), P3 (julho) e P1 (setembro). Enquanto que para o Chumbo, os valores foram superiores para o P1 nas coletas de abril e julho de 2013; para o P2 em outubro; e para P3 em setembro e outubro de 2013.

Dentre os metais que estavam acima da legislação, o Níquel foi o que apresentou os maiores valores para todos os pontos amostrados, exceto para o P2, em abril de 2013. Os valores para o Ferro, Manganês e Cobalto estavam dentro dos padrões estabelecidos, em todos os pontos de coleta e períodos analisados (Tabela 3).

Para a análise dos valores relativos à quantidade de metais no P4, foi seguida a Resolução 396/2008 do CONAMA para classificação das águas subterrâneas. Sendo assim, o P4 apresentou valores maiores que o permitido para o Cadmio nos períodos de abril, setembro e outubro de 2013 e para o Níquel, nos períodos de setembro e outubro de 2013, conforme determinado na resolução.

Tabela 3 Determinação de metais das amostras de água do córrego Água Boa durante as seis coletas (dezembro de 2012; Fevereiro; Abril; Julho, Setembro e Outubro de 2013).

		Compostos (mg L ⁻¹)						
		Cobre (Cu)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Cádmio (Cd)	Cobalto (Co)	Chumbo (Pb)	Níquel (Ni)
PONTO 1	Abril	0,0506*	0,8165	<LD	<LD	0,2461	0,2565*	0,374*
	Julho	#	#	#	#	#	#	#
	Setembro	0,0261*	0,9651	<LD	0,0305*	0,0227	<LD	0,2193*
	Outubro	0,057*	0,4107	<LD	<LD	0,1957	0,2076	0,291
PONTO 2	Abril	0,0673*	1,218	<LD	0,0468*	0,1123	<LD	<LD
	Julho	<LD	0,9331	<LD	<LD	0,1004	<LD	0,074*
	Setembro	0,0274*	1,257	0,045	<LD	0,1849	<LQ	0,2258*
	Outubro	0,0661	0,6715	0,019	<LD	0,2533	0,2377*	0,2959*
PONTO 3	Abril	<LD	0,811	<LD	<LD	0,1183	<LD	0,0823*
	Julho	<LD	1,255	<LD	0,0328	0,1201	<LD	0,1785*
	Setembro	0,0261*	0,8179	<LD	<LD	0,1843	0,2076*	0,2366*
	Outubro	0,0661*	0,5578	<LD	<LD	0,2227	0,2189	0,2502*
PONTO 4	Abril	0,0223	0,1697	<LD	0,0308*	<LD	<LD	<LD
	Julho	0,099	0,11	<LD	<LQ	0,1147*	<LD	<LD
	Setembro	0,0274	<LD	<LD	0,0298*	0,2137*	<LD	0,1964*
	Outubro	0,049	0,093	<LD	0,0202*	0,1094	<LD	0,0654*
Parâmetros Conama (357/2005)		0,013	5,0	0,5	0,01	0,2	0,033	0,025
Parâmetros Conama* (396/2008)		2,0	0,3	0,1	0,005	-	0,01	0,02

Limite de Detecção: 0,007 mg L⁻¹ (Cu); 0,014 mg L⁻¹ (Fe); 0,005 mg L⁻¹ (Mn); 0,008 mg L⁻¹ (Cd); 0,021 mg L⁻¹ (Co); 0,060 mg L⁻¹ (Pb); 0,018 mg L⁻¹ (Ni). # Não Coletado. * indica metais que apresentaram valores acima da legislação vigente (CONAMA – 357 e 396).

3.2 Determinação de Compostos Orgânicos

Os resultados da determinação de compostos orgânicos no córrego Água Boa indicaram que os tempos de retenção dos pesticidas foram de 4,84 minutos para o Thiamethoxam e de 5,38 minutos para Carbendazim (Figura 4).

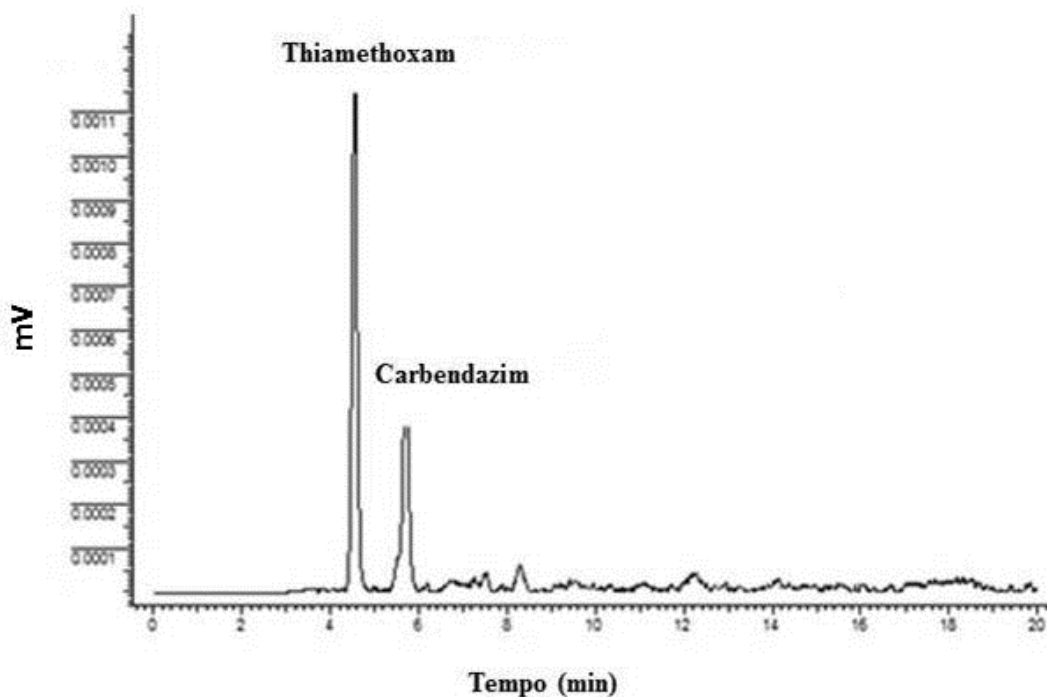


Figura 4 Cromatograma referente aos tempos de retenção dos padrões de Thiamethoxam e Carbendazim. Mv (milivoltes), Min (minutos).

As análises indicaram a presença do pesticida Thiamethoxam (inseticida neocotinóide – Toxicidade Grau II) na água dos três pontos de coleta no córrego Água Boa. Não foi detectada a presença do Carbendazim (fungicida benzimóide) na água deste mesmo córrego (Tabela 4).

Tabela 4 Determinação de compostos orgânicos na água do córrego Água Boa (Dourados, MS) nos diferentes pontos de coleta.

Compostos (ug L ⁻¹)	Pontos de Coleta			Valores permitidos – Ministério da Saúde (2.914/2011)
	1	2	3	
Thiamethoxam	1,23	1,45	1,58	^a
Carbendazim	<LD	<LD	<LD	120

Limite de detecção (LD) 0,37 ug L⁻¹ (thiamethoxam); 0,36 ug L⁻¹ (carbendazim). Limite de quantificação (LQ) 1,23 ug L⁻¹ (thiamethoxam); 1,20 ug L⁻¹ (carbendazim).

^a – Valor não encontrado

3.3 Análises Biológicas

3.3.1 Bioensaios Vegetais

Análises estatísticas referentes a índices mitóticos em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* revelaram que houve diferença significativa entre os locais (P1, P2, P3 e P4) entre os períodos de coleta (Tabela 5).

Tabela 5 Médias de Índices Mitóticos (IM) em células meristemáticas de *A. cepa* expostas às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) e CP (controle positivo) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013 e valores médios dos pontos em diferentes épocas de coleta.

Média de IM nas diferentes épocas de coleta							
Amostra	Dezembro	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro	Outubro	Média (pontos)
P1	2,79 ab	4,95 a	6,72 ab	#	5,08 a	1,25 ab	4,16 a
P2	4,60 a	7,34 a	5,14 b	3,50 a	4,32 ab	1,93 ab	4,52 ab
P3	5,31 a	6,95 a	6,93 ab	5,93 a	3,22 ab	2,86 a	5,20 ab
P4	5,55 a	6,67 a	8,44 a	6,00 a	2,70 ab	3,33 a	5,43 b
CP	0,05 b	0,11 b	0,05 c	4,48 a	1,42 b	0 b	1,02 c

Média do índice mitótico seguida pela mesma letra minúscula em determinada linha ou coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. A Coluna indica diferença estatística entre pontos de coleta e a Linha indica diferença estatística entre os meses de coleta. Média total dos pontos (independente do mês) seguida pela mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Não coletado.

Em relação às amostras de água dos pontos de coleta do mês dezembro 2012 não houve diferença do P1 (2,79) para o IM de células de *A. cepa* comparado aos pontos de coleta (P2 e P3) do córrego Água Boa e o controle (P4). No mês de fevereiro 2013 todos os pontos (P1, P2, P3 e P4) apresentaram valores estatisticamente diferentes de IM, quando comparados ao CP (0,11). Para as coletas realizadas em abril 2013, houve diferença significativa de IM entre os pontos de coleta quando comparados ao CP, mas apenas, o P2 apresentou valores significativamente menores (5,14) em relação ao P4 (8,44).

No mês de julho 2013 não houve diferença estatística de IM das amostras de água dos pontos de coleta com o CP e o P4. No mês de julho 2013 não houve coleta no P1, devido a dificuldade de acesso ao local. Em setembro, houve diferença estatística do P1 comparado ao controle positivo, não havendo diferença entre os outros pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4). As amostras de água dos P1 e P2 da coleta realizada em outubro de 2013 apresentaram

valores de IM estatisticamente iguais ao CP, demonstrando potencial citotóxico das amostras de água nesse período.

Assim, em média o CP apresentou o menor índice mitótico (1,02) e o P4 o maior (5,43). O ponto de coleta que apresentou, em média, o menor índice foi o P1 (4,16), seguido do P2 (4,52) e P3 (5,20). As análises estatísticas indicaram que houve diferença dos pontos de coleta em relação ao controle positivo e do P1 em relação ao controle negativo – P4 (Tabela 5).

Índice de alterações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

As médias dos índices de alterações cromossômicas encontradas estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6 Médias de índices de alterações cromossômicas (IAC) observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) e do CP (controle positivo) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013 e os valores médios dos pontos em diferentes épocas de coleta.

Média de IAC nas diferentes épocas de coleta							
Amostra	Dezembro	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro	Outubro	Média (pontos)
P1	0,04 a	0,20 a	0,01 b	#	0,00 b	0,08 a	0,06 a
P2	0,12 a	0,02 a	0,07 b	0,00 a	0,00 b	0,07 a	0,05 a
P3	0,04 a	0,03 a	0,24 a	0,00 a	0,09 ab	0,07 a	0,081 a
P4	0,006 a	0,03 a	0,00 b	0,00 a	0,14 a	0,13 a	0,05 a
CP	0,62 a	0,27 a	0,01 b	0,00 a	0,00 b	0,01 a	0,153 a

Média do índice de alterações seguida pela mesma letra minúscula em determinada linha ou coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. A Coluna indica diferença estatística entre pontos de coleta e a Linha indica diferença estatística entre os meses de coleta. Média total dos pontos (independente do mês) seguida pela mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. # Não coletado

Os índices de alterações cromossômicas (IAC) encontrados nas amostras de água do córrego Água Boa (P1, P2 e P3) em dezembro de 2012, fevereiro, julho e outubro de 2013

não foram estatisticamente significativos para quando comparados ao P4 - controle. No mês de abril de 2013, o P3 apresentou diferenças significativas para IAC, em relação ao P4 e aos demais pontos de coleta. O mês de setembro de 2013 os pontos P1 e P2 apresentaram diferenças significativas em relação ao P4, porém, não foi estatisticamente diferente dos P3.

Em relação às médias dos IACs não houve diferenças estatísticas dos pontos de coleta do córrego Água Boa quando comparados ao controle – P4. (Tabela 6).

As alterações cromossômicas mais frequentes em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, submetidas a tratamentos com amostras de água provenientes dos pontos P1, P2 e P3 do córrego Água Boa, foram as genotóxicas como brotos nucleares, pontes cromossômicas, perdas cromossômicas, células poliplóides, C-metáfases, aderências cromossômicas e multipolaridades (Tabela 7). Além dessas, também foram encontradas alterações mutagênicas como micronúcleos e quebras cromossômicas.

Tabela 7 Frequência de células meristemáticas de *A. cepa* com alterações cromossômicas quando expostas às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS), P4 (Poço UFGD) e CP (controle positivo) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013.

	Dezembro 2012					Fevereiro 2013					Abril 2013					Julho 2013					Setembro 2013					Outubro 2013				
	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP
MCN	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	3,4	0,2	0,0	0,2	5,2	0,0	2	6,4	0,4	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,4	0,0	2,6	1,6	1,2	0,6	0,2
BN	0,0	0,0	0,0	0,0	10,8	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
PC	0,0	1,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,0
CM	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,0
C-M	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,2	0,4	0,0	0,0	0,4	0,0	0,8	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
AC	0,0	1,0	1,2	0,2	0,0	2,0	0,4	0,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	2,2	0,0	0,0	0,0	0,2	2,2	0,0
QC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PC	1,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,2	0,6	0,8	0,0
CPO	0,0	0,2	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TCA	1,4*	3,8*	1,6*	0,2*	17,6	6,6	0,8*	1,2*	0,8*	8,4	0,4	2,4*	7,6*	0,4	0,0	#	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	4,4	0,0	2,6	2,4	2,2	4,5	0,2

MCN micronúcleos; BN broto nuclear; PC ponte cromossômica; CM célula multipolar; C-M c-metáfase; AC aderência cromossômica; QC quebra cromossômica; PC perda cromossômica; CP célula poliploide; TCA total de células com alterações cromossômicas. * estatisticamente diferente do controle negativo pelo teste Qui-Quadrado ($p < 0,05$).

Não coletado

A partir das análises estatísticas foi possível verificar que as análises indicaram que diferença estatística no número total de células com alteração (TCA) nos pontos de coleta do córrego Água Boa (P1, P2, P3) e no ponto controle (P4) em relação ao controle positivo (CP) para as coletas realizadas em dezembro 2013. Em fevereiro, essa diferença (TCA) foi significativa, apenas, para P2, P3 e P4.

As amostras de água coletadas em abril de 2013 indicaram que houve diferença estatística do P2 e P3 quando em relação ao controle positivo (CP). Nos outros meses não foram observadas diferenças estatísticas dos pontos de coleta do córrego Água Boa e do controle (P4), quando comparados ao CP.

3.3.2 Bioensaios Animais

Teste de Micronúcleo Písceo

Por meio das análises estatísticas referentes à frequência de micronúcleos nos eritrócitos de *A. altiparanae*, foi possível verificar que houve diferença significativa no número de micronúcleos dos P1, P2, P3 e P4 e entre os meses coletados (Tabela 8).

Tabela 8 Médias do número de micronúcleo (MCN) em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos às amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS) e ao P4 (Poço UFGD) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013 e valores médios dos pontos, em diferentes épocas de coleta.

Média do número de micronúcleos nos pontos de coleta							
	Dezembro	Fevereiro	Abril	Julho	Setembro	Outubro	Média total (pontos)
P1	2,80 ab	3,20 ab	14,60 a	#	8,20 a	10,60 a	7,88 a
P2	5,40 a	3,00 ab	14,80 a	15,40 a	8,20 a	10,40 a	9,53 a
P3	4,20 ab	4,20 a	8,80 a	16,60 a	9,20 a	9,20 a	8,70 a
P4	0,20 ab	0,80 b	4,60 a	3,40 b	6,80 a	3,20 b	3,16 b

Média do número de micronúcleos seguida pela mesma letra minúscula em determinada linha ou coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. Coluna diferença estatística entre pontos de coleta. Média total dos pontos (independente do mês) seguida pela mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Não coletado

No mês de dezembro 2012, o P2 apresentou o maior número de micronúcleos (5,40) em relação a todos os outros pontos de coleta, no entanto, não apresentou valores micronúcleos quando comparados ao P4 (0,20) e as demais médias. No mês de fevereiro 2013 o P3 apresentou índices significativos de micronúcleos nos eritrócitos de *A. altiparanae* (4,20), estatisticamente diferente do controle (P4) (0,80).

A coleta do P1 em julho 2013, não foi realizada devido às dificuldades de acesso ao local (alagado). No entanto, os valores de micronúcleos obtidos para o P2 (15,4) e P3 (16,6) foram os maiores e estatisticamente diferentes dos demais períodos de coleta e ao controle (P4). Em outubro de 2013, foi observado que o P1 apresentou os maiores valores superiores de micronúcleos (10,60), quando comparados aos outros pontos e ao P4, entretanto, não foi observada diferenças estatísticas entre os pontos, apenas destes em relação o controle – P4. Para as amostras de água provenientes das coletas de abril e

setembro 2013 não houve diferença significativa entre os pontos de coleta do córrego Água Boa e nem destes comparados ao P4.

O ponto que apresentou, em média, a maior frequência de eritrócitos com micronúcleos foi o P2 (9,53), provavelmente, pelo fato de estar localizado em mediações próximas ao distrito industrial. No entanto, não houve diferença significativa na frequência de micronúcleos entre os pontos de coleta P1, P2 e P3, apenas destes quando comparados ao controle (P4) (3,16) (Tabela 8).

Teste de Ensaio do Cometa em *Astyanax altiparanae*

A utilização da técnica de ensaio de cometa permitiu detectar os danos ao DNA dos espécimes de *A. altiparanae* expostos às amostras de água do córrego Água Boa. Nesta análise, foi observado que o P3 apresentou maior índice total de células com cometa, seguido do P2 quando comparados com o controle P4. O ponto que apresentou menor índice de células danificadas foi o P1 (Tabela 9).

Tabela 9 Média das diferentes classes de cometa observadas em eritrócitos de *A. altiparanae* expostos a amostras de água dos pontos P1, P2, P3 do córrego Água Boa (Dourados, MS) e ao P4 (Poço UFGD) coletadas nos meses de dezembro de 2012, fevereiro, abril, julho, setembro e outubro de 2013.

		Classes de cometa						
		TCA	CL 0	CL 1	CL 2	CL 3	CL 4	CS
Dezembro	P1	64,0 *	44,0	52,4	10,4	1,8	0,0	78,0 *
	P2	54,2 *	60,6	53,0	0,8	0,4	0,0	55,8 *
	P3	92,0 *,**	35,4	71,0	19,8	1,2	0,0	114,2 *,**,***
	P4	16,6	85,2	13,0	2,40	1,20	0,0	21,4
Fevereiro	P1	89,0	27,6	65,0	21,2	2,80	0,0	115,8
	P2	72,8	37,0	58,4	12,0	2,0	0,40	90,0
	P3	90,0	19,2	64,2	23,8	17,8	0,0	117,8
	P4	95,8	17,0	61,2	30,2	4,4	0,0	138,4
Abril	P1	72,6	33	36	19,4	14,4	2,8	140,0
	P2	69,4 *	37,6	42,6	15,4	7,8	3,6	112,0
	P3	77,4	32,2	46,2	21,8	7,8	1,6	118,8
	P4	95,8	17,0	61,2	30,2	4,4	0,0	138,4
Julho	P1	#	#	#	#	#	#	#
	P2	55,6	52,2	37,4	16,6	1,6	0,0	75,0
	P3	77,0	37,4	50,6	23,8	2,6	0,2	106,0 **
	P4	63,2	50,4	36,2	25,0	1,8	0,2	91,2
Setembro	P1	66,6 *	45,0	41,6	15,0	1,2	0,0	76,4 *
	P2	103,4 *	52,4	37,0	13,4	0,6	0,0	65,6 **,****
	P3	65,4 *	46,4	40,0	17,0	1,6	0,0	78,8 *
	P4	39,8	62,8	32,4	7,2	0,2	0,0	47,4
Outubro	P1	73,4	34,2	42,4	26,6	4,4	0,0	102,0
	P2	67,8	33,0	36,8	24,8	6,2	0,0	105,6
	P3	85,0	24,8	51,2	26,2	7,6	0,0	126,4
	P4	87,2	20,2	56,2	22,2	8,8	0,0	127,0

CL 0 Classe 0 sem danos, CL 1 Classe 1 ligeiramente danificado, CL 2 Classe 2 danificado, CL 3 e 4 Classe 3 e 4 altamente danificado, TCA total de células com cometa (classes 1, 2, 3 e 4), CS cálculo de células danificadas (número de cometas x número da classe correspondente). * estatisticamente diferente em comparação com o P4; ** estatisticamente diferente em relação ao ponto de coleta 1; *** estatisticamente diferente em relação ao ponto de coleta 2; **** estatisticamente diferente em relação ao ponto de coleta 3.
#Não coletado

Foi considerado que o número total de células com cometa (TCA) para os pontos de coleta no córrego Água Boa (P1, P2, P3), apresentou diferença significativa, quando comparados com o P4 (dezembro de 2012). Nesse mesmo período, também, foi verificado que o P3 foi estatisticamente diferente do P1, apresentando maior número de células com cometa. Em abril de 2013, apenas, o P2 apresentou índices de TCA significativos quando comparado ao P4. Em setembro de 2013 todos os pontos do córrego água Boa apresentaram valores significativos em relação ao P4 – controle. Os demais meses coletados (fevereiro, julho e outubro 2013) não apresentaram valores significativos entre si.

A análise utilizando os valores obtidos por meio do cálculo de células danificadas (CS - número de cometas x número da classe correspondente), no mês de dezembro de 2012 indicaram diferença significativa dos P1, P2 e P3, em relação ao controle (P4) e do P3 em relação aos outros pontos de coleta (P1 e P2). Em julho de 2013, o P2 apresentou valores significativos, quando comparado ao P1, embora não tenha apresentado diferenças com os P3 e P4. Em setembro 2013, o P2 apresentou diferenças significativas comparadas ao P1 e P3, no entanto, não foi significativo quando comparado ao P4. Os períodos de fevereiro, abril e outubro de 2013 não apresentaram valores significativos entre si para nenhum dos pontos.

3.3 FONTES DA VARIAÇÃO

As causas de variação e os, respectivos, quadrados médios de eritrócitos de *A. altiparanae* com micronúcleos e índices mitóticos e de alterações cromossômicas estão resumidos na Tabela 10.

Foi possível constatar que as médias de micronúcleos foram influenciadas tanto pela época quanto pelos pontos de coleta, no entanto, não foi influenciada pela interação entre eles. Os índices de divisão celular foram influenciados por todas as variáveis (fontes de variação e pela interação entre elas). Os índices de alterações cromossômicas não foram influenciados por nenhuma das fontes de variação avaliadas.

Tabela 10 Fontes da variação, graus de liberdade e os quadrados médios referentes ao número de micronúcleos de *A. altiparanae* e para os índices mitóticos e de alterações cromossômicas em *A. cepa*.

Fontes da variação	Grau de liberdade			Média dos quadrados		
	MCN	IM	IA	MCN	IM	IA
Coletas	3	4	4	13.461***	13.541***	0.033 NS
Pontos	5	5	5	12.736***	3.352***	0.169 NS
Coletas * Pontos	14	19	19	0.820 NS	1.265***	0.119 NS
CV (%)	24.50	20.15	294.59			
R²	0.72	0.78	0.25			

NS não significativo ($p > 0,5$), CV coeficiente de variação, MCN micronúcleos, IM índice mitótico, IA índice de alterações cromossômicas. *** $p < 0,001$ NS não significativo.

4 DISCUSSÃO

As atividades antrópicas (agrícolas, industriais e urbanas) afetaram a qualidade da água do córrego Água Boa. O Odor forte, a cor escura, presença de gordura nas margens e espumas não naturais na água podem estar relacionadas com o lançamento de diversos produtos químicos nesses ambientes, em virtude da presença de sólidos totais dissolvidos (Cetesb 2010). As amostras coletadas no P1 e P2, pontos estes localizados próximos aos descartes de resíduos urbanos e industriais, foram os que apresentaram maior presença de matéria orgânica em estado coloidal, indicativo de contaminação ambiental.

A concentração de oxigênio na água está relacionada com a presença de organismos fotossintetizantes, a pressão atmosférica e ao tipo de ambiente aquático (cachoeiras, córregos ou riachos). Para que não haja prejuízo à saúde dos peixes, a concentração de oxigênio não deve ser inferior a 4 mg L^{-1} (CONAMA 357/2005). No entanto, alguns corpos de água podem apresentar concentrações de oxigênio superiores a 10 mg L^{-1} , mesmo com temperaturas maiores à 20°C , caracterizando situação de supersaturação à processos de eutrofização (Cetesb 2010). As altas concentrações de oxigênio dissolvido nos pontos de coleta de água do córrego Água Boa podem estar relacionadas a um período de taxa fotossintética elevada no momento da coleta dos dados, devido ao excessivo crescimento de algas, efeito este chamado de supersaturação, conforme descrito pela Agência Nacional das Águas – ANA (2009).

A condutividade elétrica depende de concentrações iônicas e a temperatura, indica a quantidade de sais existentes na coluna de água e determina a concentração de poluentes, aumentando à medida que os sólidos totais são dissolvidos (Cetesb 2010). Os níveis de condutividade elétrica analisados estavam acima dos parâmetros permitidos pelo CONAMA (357/2005) nos três pontos de coleta do córrego Água Boa (superior a 100 s/cm), com maiores valores para os pontos P2 e P3, situados após a descarga de efluentes industriais. Assim sendo, os dados indicaram que o ambiente impactado pela presença elevada de sais, poderia ter influenciado o equilíbrio osmótico das células

animais. Esse fato poderia explicar as alterações comportamentais observadas no momento em que os peixes eram inseridos nos aquários experimentais, comparados ao experimento realizado com o P4 (água subterrânea). Embora os animais apresentassem essa dificuldade inicial de adaptação aos aquários experimentais, não houve mortalidade dos mesmos, na maioria dos bioensaios realizados, corroborando com estudos realizados por Ikefuti (2012), que sugere alterações comportamentais nos peixes à partir do aumento de condutividade elétrica na água.

As concentrações de poluentes na água dependem da diluição ou enriquecimento causado pela chuva ou drenagem de água pelos sistemas de irrigação (Christofolletti 2008). Sendo assim, os efeitos de precipitação podem influenciar os teores de compostos químicos presentes na água. Nos períodos de estiagem, ocorre aumento das concentrações de substância químicas na água, devido à diminuição de seu volume, atribuído ao processo de evaporação, que pode ocasionar maior concentração de compostos nesses ambientes (Freitas et al. 2006). No presente estudo, foi observado nos períodos com menores índices de pluviosidade (dezembro 2012 e setembro 2013) maior quantidades de alterações na água.

O desenvolvimento das atividades econômicas no decorrer dos séculos aumentou as concentrações de metais nos recursos hídricos, causando impactos nos ambientes naturais (Matsumoto & Marin-Morales 2005). De acordo com trabalhos realizados por Kabata-Pendias & Pendias (1992) e Caritá (2010), os metais, quando acima dos valores estabelecidos, são considerados, entre outros, tóxicos para plantas e microrganismos. Dentre os metais analisados nesse estudo o Cu, Pb, Cd e Ni apresentaram valores superiores ao permitido para a classe em que se classifica esse córrego, ou seja classe III, segundo resolução CONAMA (357/2005). As concentrações elevadas desses elementos, possivelmente, estão relacionadas com as influências dos efluentes do distrito industrial e das áreas agrícolas, que podem carrear diversos tipos de substâncias tóxicas ao longo de todo o percurso do córrego Água Boa até o seu deságue no Rio Dourados.

O Cu, naturalmente presente em plantas e animais, é metal essencial em pequenas quantidades. No entanto, quando existente em teores elevados, ele pode causar efeitos tóxicos nos peixes, microrganismos e até mesmo nos seres humanos (Pereira 2004). O aumento da sua quantidade na água pode estar relacionado com descarga de efluentes de estações de tratamento de esgotos, escoamento superficial, oriundo da sua utilização em processos agrícolas e industriais, além de índices pluviométricos (Rosso, 2013). Esse metal apresentou valores maiores que o permitido pelo CONAMA (357/2005) para todos os pontos amostrais (P1, P2 e P3) das coletas realizadas nos meses de setembro e outubro (estações secas).

O Pb é um metal altamente tóxico para os organismos da biota aquática, pois pode causar alterações fisiológicas, mesmo em pequenas quantidades, além de ser bioacumulável (Pereira 2004; Castro 2006). As concentrações de chumbo nas águas do córrego Água Boa apresentaram valores acima do permitido pelo CONAMA (357/2005), para todos os pontos da coleta realizada em outubro (seca), indicando assim a influência da pluviosidade em concentração de metais na água. As concentrações de níquel acima do permitido foram encontradas, para o período de outubro no P2, local este após o descarte de resíduos industriais. Este metal é introduzido nos recursos hídricos pela descarga de efluentes domésticos e industriais (Rosso 2013). O níquel pode causar alterações comportamentais nos peixes, pois age bloqueando os filamentos branquiais, causando asfixia nesses organismos (Cetesb 2012).

A presença de Pb e Ni acima dos parâmetros permitidos, aliados aos elevados índices de condutividade elétrica observados na água, poderiam explicar as alterações comportamentais observadas durante os bioensaios de *A. altiparanae*, visto que alterações na saúde dos peixes e macroinvertebrados é característica marcante deste metal (Perpetuo 2011).

O Ca é um metal naturalmente encontrado no ambiente, no entanto, alguns processos industriais (galvanoplastia, produção de pigmentos, soldas, formulação de produtos inseticidas, incineração de lixo urbano e o uso de fertilizantes agrícolas),

podem aumentar sua concentração no meio ambiente (Castro 2006; Farias et al. 2007). Valores acima dos permitidos foram encontrados para o cádmio na água do Córrego nas amostras do P2 (abril). É importante considerar que no período de abril (maior índice de pluviosidade) diversos fertilizantes são utilizados em culturas de milho nesses locais, possibilitando a lixiviação destes compostos para o córrego e, conseqüentemente, aumentando a possibilidade de contaminação.

As análises cromatográficas indicaram a presença de Thiamethozam nas amostras de água, sendo que este composto apresenta facilidade de dispersão pelo solo e potencial de contaminação dos ambientes aquáticos (Oliveira et al. 2009; Rosso 2013). O referido produto foi encontrado em P1, P2 e P3 do córrego Água Boa, sugerindo que seus resíduos tenham sido lixiviados para o córrego. A existência deste produto está associada a sua ampla utilização em culturas agrícolas (milho e cana-de-açúcar) na região de Dourados (MS) (Anvisa 2001; Rosso 2013).

Diversos estudos correlacionaram as concentrações elevadas de Cu, Pb, Cd e Ni e de pesticidas com alterações nos processos de divisão celular e alterações cromossômicas (Fernandes et al. 2007; Kataeva et al. 2012; Moralejo & Acebal 2014).

A existência desses contaminantes na água deste córrego pode ser responsável pelas alterações genéticas (presença de micronúcleos, danos ao DNA e alterações cromossômicas) que ocorreram nos organismos testes (*A. cepa*; *A. altiparanae*) utilizados neste biomonitoramento. Dessa forma, foi possível observar que as atividades agroindustriais, que se encontram nas proximidades deste córrego, podem afetar negativamente esse recurso hídrico, como também foi observado no rio Sava (Croácia) (Radic et al. 2010); no rio Monjolinho (Brasil) (Bianchi et al. 2011) e no rio Pirapó (Brasil) (Peron et al. 2009).

O potencial citotóxico de um composto pode ser determinado pelos índices de divisão celular, sendo possível avaliar o potencial de determinada substância em inibir ou aumentar a proliferação celular (Fernandes et al. 2007). Assim, o aumento ou diminuição nos índices mitóticos das células meristemáticas de *A. cepa* pode ser usado

para avaliar os níveis de poluição dos ambientes por compostos tóxicos e citotóxicos (Caritá 2010). As análises das amostras de água do córrego Água Boa apresentaram significativo potencial citotóxico, principalmente, para os P1 e P2 comparado ao controle negativo. Estes pontos estão localizados próximos ao aterro sanitário e distrito industrial o que sugere que substâncias decorrentes dessas atividades estejam afetando a qualidade da água desse córrego.

Metais podem interferir nos índices de divisão celular, induzindo em alterações cromossômicas e levando a formação de micronúcleos, que evidencia o seu potencial mutagênico e citotóxico sobre os vegetais superiores e suas influências em tecidos animais (Christofoletti 2008). Os resultados dos ensaios de *A. cepa* com realizados com amostras de água do córrego Água Boa indicaram que nos períodos de coleta em que quantidade de metais (setembro e outubro) foi alta houve uma diminuição no IM, em relação aos outros períodos de coleta, indicando a possibilidade dos metais detectados (cobre, chumbo, níquel ou cádmio), bem como da presença de pesticida, estarem comprometendo o desenvolvimento e crescimento dos organismos expostos.

A citotoxicidade de amostras de água, que apresentavam concentrações de Ni, Pb e Cu acima do permitido pelo CONAMA (357/2005) foi demonstrada por Bianchi et al. (2011) e Marcano et al. (2006), sugerindo que a diminuição no índice de divisões celulares pode estar relacionada com presença de metais nas amostras de água.

A análise de divisão celular nas células meristemáticas de *A. cepa* possibilitou identificar alterações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas em tecidos vegetais tratados com amostras de água dos pontos de coleta do córrego Água Boa, segundo Majer et al. (2005). As alterações nos processos de divisão celular evidenciam o surgimento de alterações cromossômicas, que podem ou não ser reparadas.

As alterações cromossômicas observadas nas amostras de água dos três pontos de coleta do córrego Água Boa foram brotos, pontes, perdas, c-metáfases, aderências, multipolaridades e micronúcleos, que evidenciaram a ação de agentes químicos nesses locais.

Essas alterações estão relacionadas com problemas na organização dos microtúbulos citoplasmáticos, promovida pela ação de substâncias aneugênicas, capazes de induzir alterações cromossômicas. Muitas substâncias químicas, como as existentes em metais e pesticidas, podem promover esse efeito (Fernandes 2005). Dessa forma, as substâncias, tais como o Thiamethoxam e metais, encontradas na água do córrego Água Boa, podem estar agindo nos processos de divisão celular, causando divisões incorretas e formação de alterações cromossômicas.

Apesar da escassez de estudos que comprovem a toxicidade do Thiamethoxam em células meristemáticas de *A. cepa* os índices de alterações encontrados e a presença de metais na água do córrego sugerem que estes possam estar relacionados às alterações genéticas encontradas. Além disso, os resultados apontaram para o fato de que as substâncias presentes na água deste córrego variem em função do tempo (estação, período), do tipo de atividade humana (urbana, industrial, agrícola) e da descarga de efluentes.

Além disso, as alterações cromossômicas podem estar diretamente relacionadas com a formação de micronúcleo nas células (Bianchi & Marin-Morales 2011). A indução de micronúcleos pode ocorrer tanto por ação aneugênica (ação no fuso mitótico) como clastogênicas (quebras cromossômicas) decorrentes da ação de agentes químicos presentes nos ambientes (Matsumoto et al. 2006; Caritá 2010).

Os resultados das amostras para o índice de micronúcleos em *A. altiparanae* nos P2 e P3 (situados após os descartes industriais), apresentaram as maiores médias de eritrócitos com micronúcleos, indicando que os compostos químicos encontrados na água (Cu, Cd, Pb, Ni e Thiametoxan) desses locais podem estar induzindo alteração do fuso mitótico, influenciando o aparecimento de perdas ou atrasos cromossômicos que levam genotoxicidade nos organismos.

Estudos realizados por Duarte et al. (2012) onde os autores relacionam altas concentrações de metais com a presença de danos nos eritrócitos de tilápias, sugerem

que os efeitos genotóxicos encontrados nas células desses animais estejam relacionados com os metais presentes nas amostras de água.

A presença de agentes genotóxicos em amostras de água podem levar a perda da integridade do DNA, por induzir a quebras de material genético e ao, consequente, danos ao DNA. A presença significativa de eritrócitos com classes de cometa (1, 2, 3, 4) no P3, em comparação com o P4 e os demais pontos de amostragem (P1 e P2), indicaram que o maior potencial genotóxico foi identificado nos pontos onde a descarga industrial era maior (P2 e P3), índices pluviométricos menores (setembro e outubro) e a existência de metais como cobre, cádmio, chumbo e níquel estavam acima dos parâmetros.

O ensaio de cometa foi um ensaio eficiente para detectar os efeitos causados nos eritrócitos de *A. altiparanae*, devido às substâncias químicas presentes na água, decorrentes de atividades agrícolas ou industriais. Além disso, o ensaio de cometa apresenta maior sensibilidade para identificar os possíveis danos simples causados ao DNA, pois estes podem ser reparados, enquanto que o teste de micronúcleo detecta danos já estabelecidos no DNA (Ramsdorf 2007).

A utilização de bioensaios vegetais e animais permitiu verificar que os organismos testes animais apresentam maior sensibilidade para identificar os efeitos genotóxicos causados por substâncias tóxicas, pois os mesmos sofrem bioacumulação dos poluentes. Deve se destacar, também, que isso está relacionado com a posição de determinada espécie na cadeia alimentar, pois nos níveis tróficos mais altos, há maior concentração de poluentes, influenciando na sensibilidade desses organismos aos tóxicos (Porto et al. 2005).

Os efluentes domésticos, industriais e agrícolas são potenciais contaminantes da água do córrego Água Boa, pois apresentam diferentes substâncias em sua composição (metais e pesticidas), capazes de interagir nas células dos organismos, afetando toda a biota aquática. Assim, aliar as análises químicas e físico-químicas aos testes de

citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade possibilita monitorar, com maior precisão, a qualidade da água de diversos rios e córregos.

5 CONCLUSÕES

Compostos químicos como Cd, Pb, Cu e Ni (acima dos níveis permitidos), além de pesticida (Thiamethoxam) foram identificados na água do córrego Água Boa (Dourados, MS). Os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos desses contaminantes foram identificados sobre os organismos utilizados neste trabalho (*A. cepa*, *A. altiparanae*). Além disso, a pesquisa gerou informações referentes à qualidade da água deste córrego, servindo de modelo para planos de controle da qualidade de córregos e lagos.

É importante que o biomonitoramento do córrego Água Boa seja feito constantemente, sugerindo a necessidade de medida de recuperação da qualidade das suas águas, uma vez que percorre grande parte da cidade de Dourados e desagua no Rio Dourados, onde pode influenciar na qualidade das águas utilizadas para abastecimento da população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Águas – ANA (2009) Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das Águas (PNQA) 222p.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2001) Resolução – RDC n° 12, de 2 de Janeiro de 2001.

Araújo JJ, Dallos JAG (2006) Metodología para la determinación de residuos de fungicidas benzimidazólicos em fresa y lechuga por HPLC-DAD. **Rev Colomb Quím** 35:67-79.

Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos SA (2005) BioEstat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá 324p.

Bianchi J, Espindola ELG, Marin-Morales MA (2011) Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotox Environ Saf* 74:826-833.

Campos BF, Junior VA, Gaona JC (2010) Avaliação de nascentes e cursos de água sob a ótica do planejamento e gestão ambiental urbana: subsídio à “regionalização” das problemáticas sócio-ambientais. ENEPE, Universidade Federal da Grande Dourados.

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

Castro SV (2006) Efeitos de Metais Pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do Alto Rio das Velhas-MG. Dissertação, Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Christofoletti CA (2008) Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB (2010) Variáveis de qualidade das águas.

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB (2012) Níquel e seus compostos. Ficha de informação toxicológica 3p.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2005) Resolução n° 357, 17 de Março de 2005 27p.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2008) Resolução n° 396, 3 de Abril de 2011 11p.

Duarte IM, Dias MC, David JAO, Matsumoto ST (2012) A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. Braz J Biosc 10:211-219.

Farias MSS, Neto JD, Lima VLA, Lira VM, Franco ES (2007) Riscos sociais e ambientais devido a presença de metais pesados nas águas superficiais no distrito industrial d mangabeira. Qualitas Rev Elet 6:1-10.

Fernandes TCC (2005) Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest Biochem Physiol* 88:252–259.

Freitas LAD, Santos MJS, Santos JS, Santos MLP (2006) Avaliação das influências das chuvas no processo de salinização de áreas inundadas na bacia do Rio de Contas em Jequié-BA. Resumo, Sociedade Brasileira de Química.

Goulart MDC, Callisto M (2003). Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Rev FAPAM* 1:9p.

Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Mcgregor JT, Newell GW, Salamone NF (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res* 123: 61-118.

Ikefutti CV (2012) Hematologia e Ecotoxicidade do Teflubenzuron no controle de *Trichodina sp.* em peixes. Dissertação, Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista.

Kabata-Pendias A, Pendias H (1992) Trace elements in soils and plants. 2:365p.

Kataeva M, Kotseruba V, Terekhina N, Kutlunina N, Beljaeva A (2012) Allium Root-Micronucleus (Allium-MCN) Teste on the Genotoxicity of Soil Samples Contaminated with Heavy Metals. *World Applied Sci J* 17:992-1000.

Majer BJ, Grummt T, Uhl M, Knasmüller S (2005) Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. *Acta Hydrochim. Hydrobiol* 33:45-55.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MI, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA (2006) Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. Genet. Mol. Biol 29:148-158.

Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, nº 239,14 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 39-46.

Matsumoto ST, Marin-morales MA (2005) Toxic and genotoxic effects of trivalente and hexavalent Chromium _ A review. Rev Bras Toxicol 18:77-85.

Marcano L, Carruyo I, Fernandez Y, Montiel X, Torrealba Z (2006) Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and it correlation with toxicity. Biocell 30: 259-267.

Moralejo MDP, Acebal SG (2014) The transfer of Cu, Zn, Mn and Fe between soils and *Allium* plants (Garlic and Onion), and Tomato in the Southwest of the Buenos Aires Province, Argentina. Am J Plant Sci 5:480-487.

Oliveira VS, Lima JM, Carvalho RF (2009) Sorção do inseticida Tiametoxam em latossolo sob efeitos de fosfato de vinhaça. Quim Nova 32:1432-1435.

Pereira RS (2004) Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Ver Elet Recursos Hídricos 1:20-36.

Peron AP, Canesin EA, Cardoso CMV (2009) Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. Revista Bras Biocien 7:155-159.

Perpetuo EA (2011) Parâmetros de caracterização da qualidade das águas e efluentes industriais. Laboratório de Microbiologia, Univesidade de São Paulo.

Porto JIR, Araújo CSO, Felberg E (2005) Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environ Res** 97:287-292.

Ramsdorf W (2007) Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

Rádic S, Stipanicev D, Vujcic V, Rajcic MM (2009) The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Sci Total Environ* 408:1228-1233.

Rosso GT (2013) Avaliação de metais e pesticidas em peixes, águas e sedimentos coletados no córrego Curral de Arame, Dourados, MS. Dissertação, Departamento de Química, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul.

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

Souza RA (2007) Avaliação de metais em águas da sub-bacia hidrográfica do rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul. Dissertação, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Ventura CB (2004) Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M (2009) Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 75:1453–1460.

CAPÍTULO III

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E DAS CARACTERÍSTICAS
MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DO CÓRREGO CURRAL DE ARAME
(DOURADOS, MS)**

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA ÁGUA DO CÓRREGO CURRAL DE ARAME (DOURADOS, MS)

Priscila Leocádia Rosa Dourado. Alexéia Barufatti Grisolia

P.L.R. Dourado. A.B.Grisolia

Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias

Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil

E-mail: Priscila_dourado_259@hotmail.com

RESUMO

A poluição dos ecossistemas aquáticos tem sido desencadeada pelo lançamento de inúmeras substâncias químicas, que podem determinar a degradação ambiental e a diminuição da disponibilidade de água de qualidade. Estas interferências estão ocorrendo em diversos rios ou córregos, que se encontram próximos a áreas industriais ou agrícolas. O córrego Curral de Arame (Dourados, MS) tem sua nascente em fragmento de mata ciliar. Ao longo do seu curso o córrego sofre influência de resíduos provenientes de atividades agrícolas ou de criação de animais nas suas proximidades. O objetivo do trabalho foi monitorar a qualidade da água do córrego Curral de Arame, por testes citogenéticos e análises microbiológicas, com intuito de gerar subsídios que auxiliem planos de gestão de qualidade de água. As amostras de água foram coletas no período de Janeiro à Novembro 2013 em três pontos que se diferenciam em P1 (nascente do córrego), P2 (região de intensa atividade agrícola) e P3 (atividade agrícola e criação de animais). A avaliação de ocorrência de metais e compostos orgânicos (pesticidas e antibióticos) na água do córrego foi realizada por meio de espectrometria de absorção atômica em chamas e cromatografia líquida, respectivamente. Testes com *Allium cepa* e *Astyanax altiparanae* foram realizados para avaliar as propriedades citotóxicas, mutagênicas e genotóxicas da água. As análises das condições microbiológicas da água foram realizadas pela pesquisa de Coliformes Totais, Termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Pseudomonas sp.* As análises estatísticas para os biotestes genéticos foram realizadas por meio de teste ANOVA e,

quando significativo, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$). O teste de Qui-Quadrado foi usado para os ensaios do cometa. Os resultados referentes à frequência de micronúcleo, ensaio de cometa e testes de *A. cepa* indicaram que houve diferença significativa entre os meses, os pontos coletados (P1, P2 e P3). Os pontos que apresentaram alterações genéticas foram os localizados próximos às culturas agrícolas e criações de animais (P2 e P3). Nesses locais as análises químicas revelaram maior quantidade de metais e a presença de antibiótico na água. O monitoramento mostrou que as atividades de agricultura e criação de animais influenciaram na qualidade da água do córrego. Os resultados deste trabalho indicam a eficiência dos biotestes para avaliar danos genéticos dos organismos expostos, relacionados à presença de contaminantes, e que pode ser utilizado como ferramentas de controle para planos de gestão de qualidade da água.

Palavras-chave: monitoramento ambiental, mutagenicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, biomarcadores, ambientes aquáticos.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior consumidor mundial de substâncias químicas utilizadas em atividades agrícolas, sendo o maior gasto realizado com agrotóxicos, principalmente, nas culturas de soja (aproximadamente 35%) (Santos & Monteiro 2004). O Estado do Mato Grosso do Sul ocupa o oitavo lugar no Brasil em produção agrícola, principalmente com culturas temporárias como algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho, soja, feijão, trigo (IBGE 2014). Essas culturas se encontram em maior produção nas regiões norte-nordeste e sul do Estado, onde se localiza a cidade de Dourados, MS, considerada a terceira maior área produtora desse Estado.

O crescimento de atividades associadas à agricultura contribuiu para aumento na quantidade de substâncias químicas lançadas no meio ambiente, em especial, nos ambientes aquáticos, levando a degradação da biodiversidade e a falta de sustentabilidade dos ecossistemas (Ventura et al. 2008).

Os resíduos urbanos, industriais e agrícolas podem adicionar grandes quantidades de contaminantes nas águas superficiais, causando problemas a toda biota do ecossistema aquático, diminuindo, consideravelmente, a quantidade de água com qualidade (Pereira 2004).

A necessidade de aumento da produtividade nas safras agrícolas propiciou o uso indiscriminado de compostos químicos, trazendo consequências ao meio ambiente e à saúde pública. Devido à facilidade de sua dispersão no ambiente, estes podem contaminar a água, o solo e os alimentos, desencadeando doenças, incluindo o câncer, além de afetar os diferentes níveis tróficos de cadeia alimentar (Fernandes 2005; Kruger 2009).

Dessa forma, mesmo apresentando padrões de quantidade esperados pela legislação vigente, esses compostos podem alterar as relações biológicas dos organismos, gerando problemas de qualidade de vida para as populações que utilizam esses recursos naturais (Buss et al. 2003).

A origem das substâncias químicas utilizadas na indústria e agricultura tem sido muito pesquisada nos últimos anos, devido ao seu potencial mutagênico e carcinogênico. Muitas dessas substâncias são encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos agrotóxicos e nos complexos de efluentes industriais e domésticos, podendo causar mudanças no material genético das células (Vogel 1982; Ventura et al. 2008).

O uso de parâmetros biológicos, tem sido aplicado, para medir a qualidade da água e as condições ambientais de recursos hídricos, devido ao fato, destes informarem a presença de poluentes, mesmo em pequenas quantidades, sejam eles naturais ou antropogênicos (Bus et al. 2003).

Considerando que parâmetros físico-químicos muitas vezes não indicam a situação de contaminação ambiental determinada pelo descarte indiscriminado de produtos químicos nos ambientes aquáticos, pesquisas que avaliem a toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade desses compostos no ambiente tornam-se de grande importância (Ventura et al. 2008; Ràdic et al. 2008). Além disso, dependendo da natureza química e da concentração, esses compostos podem desencadear alterações nas células dos organismos expostos (Fernandes 2005; Armas 2007; Kruger 2009), tais como interferências na divisão celular e reações diretas como o DNA.

Diante do exposto, a utilização de biotestes que demonstrem os danos genéticos derivados da presença de poluentes (industriais e agrícolas) constituem ferramentas importantes para auxiliar planos de monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos naturais. O presente trabalho teve como objetivo monitorar a qualidade da água do córrego Curral de Arame (Dourados, MS), corpo hídrico que recebe efluentes agrícolas, por meio de análises microbiológicas, e químicas biológicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área de Biomonitoramento

As amostras de água foram coletadas no córrego Curral de Arame pertencente à bacia do Rio Dourados na região da Grande Dourados no Estado de Mato Grosso do Sul. As coletas foram realizadas durante os meses de Janeiro à Novembro de 2013 totalizando seis coletas em três pontos distintos, em que ponto 1 P1 (S 22.21062° W 054.91356), localiza-se na nascente do córrego, com a mata de preservação, conhecida como Mata do Azulão, o ponto 2 (P2) (S 22.25989° W 054.87807°) apresenta nas proximidades monoculturas de cana-de-açúcar, milho ou soja em área de intensa atividade agrícola e o ponto 3 (P3) (S 22.39558° W 054.84671°) localiza-se em área de influência agrícola e de criação de animais (porco, aves e gado) e, ainda, camping para pescadores amadores (Figura 1). A localização dos pontos de coleta foi identificada por meio do GPS (*Global Positioning System* - Sistema de Posicionamento Global).

Alterações no ambiente relacionadas à conservação da mata ciliar, coloração e odor da água no momento da coleta foram observados nos P1, P2 e P3 durante os meses de coleta (Janeiro, Março, Maio, Agosto, Setembro e Novembro de 2013). As interferências encontradas no ambiente foram perda da mata ciliar e pequenas áreas degradadas ao longo do percurso no Córrego Curral de Arame (Figura 2).

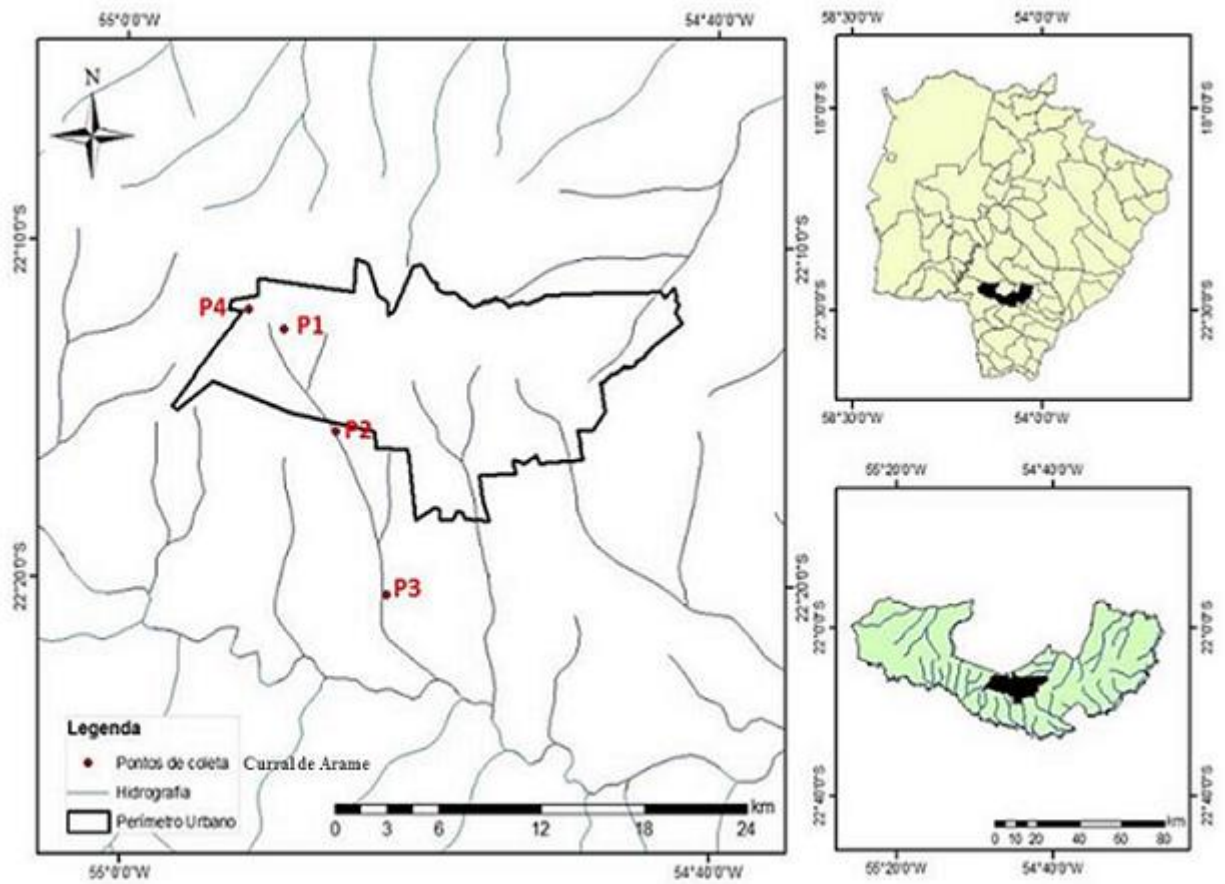


Figura 1 Mapa dos pontos de coleta no córrego Curral de Arame (P1, P2, P3) e Poço Artesiano da UFGD (P4) na cidade de Dourados/MS.



Ponto 1

Ponto 2



Ponto 3

Figura 2 Pontos de coleta de água (P1, P2 e P3) do córrego Curral de Arame (Dourados, MS).

As condições físico-química da água do Córrego Água Boa e dados pluviométricos foram mensurados para obtenção das características ambientais.

Os parâmetros referentes à temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), pH; oxigênio dissolvido (OD ($\text{mg L}^{-1} \text{O}_2$); condutividade elétrica (Cond (uS/cm^2) e os sólidos totais dissolvidos (TDS (mg L^{-1}) foram mensurados nos pontos de coleta, por meio de sonda multiparâmetro HI 9829 da marca Hanna.

Os dados pluviométricos de Dourados (MS) foram medidos, baseados em mensurações meteorológicas realizadas pela Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados, MS.

2.2 Coleta de água

As coletas das amostras de água nos pontos P1, P2 e P3 no córrego Curral de Arame (superficial) foram realizadas no mesmo dia da semana (Segunda-feira) e em horários similares. Também foi coletada água de poço artesiano (subterrânea) do tanque de abastecimento da Universidade Federal da Grande Dourados (P4 - controle). As amostras para os bioensaios com os peixes (lambaris) foram coletadas em galões de 20 litros em cada ponto. As amostras de água para os testes com *Allium cepa* foram coletadas em frascos de polietileno de 250 mL. Os galões ou frascos foram previamente higienizados antes das coletas.

As amostras de água destinadas às análises químicas (metais e pesticidas) foram coletadas em frasco âmbar de 1L e refrigeradas até o momento de análise. Para a determinação de metais, acidificou-se a água com ácido nítrico.

As amostras de água para as análises microbiológicas foram coletas na margem do córrego, em 20 cm de profundidade, com potes de vidro de 500 mL (estéreis). As amostras foram transportadas em caixa térmica com gelo, sendo 8 horas o tempo máximo, entre a coleta de água e o início do exame microbiológico.

2.3 Análises Químicas

2.3.1 Determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn

O preparo das soluções para análise dos metais presentes nas amostras de água foi feito com água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω cm) obtida a partir de deionizador *Millipore Milli-Q Academic* (Beadford[®], EUA).

A determinação de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foi feita utilizando espectrômetro de absorção atômica em chama AA 240FS (*Agilent Technologies*[®], EUA) equipado com lâmpadas de cátodo oco (LCO) monoelementares. As medidas de absorbância foram feitas utilizando as linhas analíticas de Cu (324,7 nm), Fe (248,3 nm), Mn (279,4 nm), Zn (213,8 nm), Cd (222,8 nm), Co (240,7 nm), Cr (357,9 nm), Ni (232,0 nm) e Pb (217,0 nm). As soluções foram aspiradas para o interior do sistema nebulizador/queimador e os elementos foram atomizados com taxa de aspiração fixada em 5,0 mL min⁻¹. Todas as medidas foram feitas com três repetições.

Soluções estoque de 5,0% (m/v) de lantânio (La) foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 58,6 g La₂O₃ 99,9% (m/m) (Vetec[®], Brasil) em 120 mL de HCl concentrado e diluindo a 1000 mL com água deionizada.

As soluções de calibração multielementares foram preparadas a cada rotina de trabalho, por meio de diluição apropriada das soluções estoques monoelementares (1000 mg L⁻¹, SpecSol[®], Brasil), nos intervalos 0,0 – 2,0 mg L⁻¹ Zn; 0,0 – 4,0 mg L⁻¹ Mn; 0,0 – 10,0 mg L⁻¹ Co e Ni; 0,0 – 15,0 mg L⁻¹ Cr e Pb em meio de 1,0% (m/v) La e 1,0% (v/v) de HNO₃.

Para o procedimento de preparo de amostra, foram transferidos 200 mL de água para um erlenmeyer, e adicionados 10 mL de HNO₃ 37% (v/v) (Vetec[®], Brasil). A mistura contendo amostra e reagentes foi levada para chapa de aquecimento a 90 °C, para a etapa de pré-concentração da solução amostra. O volume foi reduzido até, aproximadamente, 30,0 mL e ajustado a 50,0 mL em balão volumétrico com água ultrapura.

A descontaminação dos materiais utilizados no preparo das soluções foi feita, inicialmente, com água corrente e posteriormente imersos em banho contendo solução a

10% (v/v) de HNO₃ por 24 horas. Em seguida os materiais foram enxaguados com água deionizada.

Os principais parâmetros de confiabilidade analítica, como limite de detecção e de quantificação, foram calculados pelo método da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), empregando os programas como Microsoft Excel[®] e Microcal OriginPro[®], como ferramenta de cálculo.

2.3.2 Determinação de compostos orgânicos

Extração dos constituintes

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e 200 mL de cada amostra sofreu o processo de extração de fase sólida (SPE). O processo consistiu em: ativação do cartucho com 20 mL de metanol para abertura das cadeias poliméricas; acondicionamento dos cartuchos com 20 mL de água ultrapura; inserção de 200 mL de amostra; eluição com 20 mL de metanol e, posteriormente, com 20 mL de acetato de etila. As frações metanólica e de acetato de etila de cada amostra foram unidas e evaporadas. Posteriormente foram rediluídas em 100 µL de metanol, passaram por membrana de 0,20 µm e foram analisadas por HPLC em no máximo dois dias após o preparo, sendo que neste período foram armazenadas à -5 °C.

Condições cromatográficas

Considerando-se que dentre os pesticidas neonicotinoides e os fungicidas benzimidazóis, utilizados nas áreas agrícolas da região de Dourados, destacam-se o Thiametoxan e Carbendazim, respectivamente. Além disso, é comum o uso de antibióticos em criações de animais. Dessa forma, foram realizadas análises para pesticidas thiamethoxam, carbendazim e do antibiótico oxitetraciclina em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), modelo LC-6AD, sistema binário, detector espectrofotométrico (UV-VIS) com comprimentos de onda entre 200 a 800 nm, coluna Cromatográfica com fase estacionária C18 Phenomenex Gemini (25cm x 4,6mm x 5 µm) e pré-coluna de mesma fase.

Determinação analítica dos compostos

Os limites de detecção foram determinados por injeções de 20 µL (n = 5) de solução conhecida dos compostos e, em seguida, diminuindo as concentrações até a detecção de um pico com relação sinal/ruído de três. A concentração correspondente das amostras foi considerada como sendo a concentração mínima detectável. Os limites de quantificação foram determinados, empregando-se a mesma metodologia, porém foi considerado o pico cromatográfico com relação sinal/ruído de dez.

A estimativa do conteúdo dos compostos orgânicos nas amostras foi realizada por calibração externa. As soluções empregadas na curva analítica foram preparadas empregando as soluções de trabalho diluídas em metanol grau cromatográfico, resultando em diferentes concentrações. Alíquotas de 20 µL foram analisadas por HPLC, em cinco repetições. Uma regressão linear de mínimos quadrados das áreas dos picos, em função das concentrações, foi realizada para determinar os coeficientes de correlação. Os parâmetros da equação (inclinação e intercepção) de cada curva padrão foram utilizados para obter os valores de concentração para as amostras. As amostras com concentração superior as derivadas para a curva analítica da curva analítica foram testadas, novamente após a diluição adequada.

2.5 Análises Microbiológicas

As técnicas adotadas para quantificar os microrganismos da água foram baseadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, publicado pela *American Public Health Association* (APHA, 2005). Os testes realizados foram índice de Coliformes Totais e Termotolerantes, presença de *E. coli*, *Salmonella sp.* e *Pseudomonas sp.*

2.5.1 Pesquisa de Coliformes Totais, Termotolerantes e *E.coli*

A pesquisa de Coliformes Totais, Termotolerantes e *E.coli* seguiu a Técnica dos Tubos Múltiplos, com diluição seriada até 10^{-3} , passou-se 1,0 mL de cada diluição seriada para a triplicata de tubos contendo Caldo Lauril Triptose (MERCK) e incubou a 35-37°C

por 24-48. Os tubos que apresentaram crescimento e produção de gás foram inoculados com uma alçada em tubos de Caldo Bile Verde Brilhante (CBVB) (HIMEDIA) para a confirmação dos coliformes totais, e uma alçada para o Caldo EC (ISO FAR) para a confirmação dos coliformes termotolerantes. Os tubos de CBVB foram incubados em 35-37°C por 24-48 horas e os tubos de Caldo EC incubados a 42°C por 24-48 horas. Os tubos que apresentaram crescimento bacteriológico e produção de gás foram considerados positivos. O número de coliformes totais e termotolerantes foram expressos segundo a tabela específica do Número Mais Provável (NMP) (APHA 2005; Silva et al. 2010).

A partir dos tubos positivos (crescimento com produção de gás) para coliformes termotolerantes (EC), transferiu-se uma alçada carregada para o meio Ágar EMB (EosinMethylene Blue Agar) (HIMEDIA) seletivo de *Escherichia coli*. As placas que apresentaram crescimento de colônias com o brilho verde metálico foram consideradas positivas.

2.5.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. as amostra foram pré-enriquecidas adicionando 25 mL da amostra de água e em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (HIMEDIA) e incubada a 37°C durante 24h. Em seguida, transferiu-se 1 mL do caldo de pré-enriquecimento para o Caldo Selenito Cistina (SC) (ISO FAR) e 0,1 mL para Caldo de Rappaport Vassiliadis (RV) (ISO FAR) para enriquecimento seletivo. Incubou-se o SC a 35-37°C por 24 horas, e o RV a 42°C por 48 horas. Após o enriquecimento seletivo, os caldos SC e RV foram inoculados em duplicata por estrias descontinuas no Ágar de Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD) (ISO FAR) e incubados a 37°C por 24 horas (APHA 2005; Silva et al. 2010).

2.5.3 Pesquisa de *Pseudomonas* spp.

Para a pesquisa de *Pseudomonas*, 25 mL da amostra de água foi enriquecida em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (HIMEDIA) e incubada a 37°C durante 24h. Após o enriquecimento inoculou-se a amostra por estrias descontinuas em duplicata em placas de

Ágar Cetrimide (MERCK) seletivo de *Pseudomonas* e encubou-se a 37°C por 24-48h. As placas que apresentaram crescimento bacteriológico foram consideradas positivas para *Pseudomonas* (APHA, 2005; Silva et al., 2010).

2.4 Análises Biológicas

2.4.1 Biotestes Vegetais

Para os testes com sementes de *A. cepa* foram preparadas cinco placas de petri com 50 sementes (*A. cepa* variação Baía Periforme). Três placas foram utilizadas para os ensaios com amostras de água do córrego Curral de Arame (P1, P2 e P3) e as outras duas destinadas à água do tanque da UFGD (P4 - controle) e ao controle positivo (CP) o agrotóxico Volcane® (190 µL/ 100mL).

As sementes expostas aos tratamentos por 96 horas foram coletadas com, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento das raízes. Os meristemas apicais de cada semente foram fixados em Carnoy 3:1 (v/v) etanol/ácido acético glacial por 6 horas. Em seguida as raízes foram hidrolizadas com HCL 1N a 60 °C por 10 minutos, lavadas com água destilada e coradas com Reativo de Schiff por 2 horas.

Para cada tratamento, foram preparadas 5 lâminas, contendo uma radícula por lâmina e contadas em microscópio de luz Nikon, no aumento de 400x. De cada lâmina contou-se 1000 células, totalizando, assim, 5000 células por tratamento. O índice mitótico (IM) e o índice de alteração cromossômica (IA) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo descritas. As alterações mais representativas foram fotografadas com câmera Sony H-50

IM = número de células em divisão / número de total de células contadas x100

IA = número de células com alteração / número de total de células em divisão contadas x100

2.4.2 Biotestes Animais

As amostras de água oriundas dos pontos P1, P2, P3 (córrego Curral de Arame) e do P4 (água subterrânea da UFGD) foram colocadas em aquários de vidro (40 x 30 x 20 cm) devidamente aerados, à temperatura ambiente, durante um período de 24h.

Os peixes (*Astyanax altiparanae*) utilizados para o bioensaio foram fornecidos pela Piscicultura Douradense (Dourados/MS), transportados da Piscicultura até o Laboratório em galões de água aerados e colocados nos aquários, primeiramente preparados com as amostras de água. Esses peixes permaneceram em condições experimentais por 72 horas.

Dez peixes (tamanho aproximado de 8 cm) foram aclimatados em cada aquário, sendo que 5 destes foram utilizados para o teste de micronúcleo písceo e os demais para o ensaio de cometa.

Teste de Micronúcleo Písceo em *A. altiparanae*

Os espécimes de *A. altiparanae* foram coletados após 72 horas de exposição e anestesiados com Benzocaína 2% v/v (solúvel). Em seguida, os animais foram sacrificados e com tesoura realizou-se o corte na nadadeira caudal para coleta de sangue destinado ao esfregaço, para contagem de eritrócitos.

A contagem de micronúcleos seguiu o protocolo descrito por Schmid (1975) e Heddle (1983) com algumas adaptações. O sangue coletado na região caudal (0,1 mL) foi colocado na superfície da lâmina (limpas e identificadas) e, com auxílio de outra lâmina, foi realizada uma extensão sanguínea. Após secagem ao ar, as lâminas foram fixadas, por 10 minutos, em etanol. De cada peixe foram feitas duas extensões sanguíneas.

As lâminas foram coradas com coloração rápida para hematologia (Panótico Rápido LB) seguindo o protocolo do fabricante. A contagem dos micronúcleos foi realizada com auxílio de microscópio óptico Nikon (400X). De cada peixe foram contadas, com auxílio de

um contador manual, 2.000 células. Somente as hemácias com membrana celular e citoplasmática intactas foram consideradas para as análises.

Ensaio do cometa em *A. altiparanae*

O teste de cometa em *A. altiparanae* foi adaptado da metodologia proposta por Ventura (2004). O sangue do peixe foi coletado por punção branquial e 6 μL diluído em 2000 μL de solução salina (PBS). Duas lâminas foram confeccionadas para cada peixe e montadas com 20 μL de suspensão celular e 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % (v/v) a 37 °C. As lâminas permaneceram em solução de lise, à 4 °C, por 1 hora. Após a lise, as lâminas foram armazenadas em tampão NaOH 0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ (pH>13) por 20 minutos para desnaturação do DNA, sendo submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos. As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹) e 100 nucleóides de cada uma delas foram observados em microscópio de fluorescência da marca Labomed (modelo T121100), equipado com filtro de B-3^A (excitação $\lambda = 350 - 580$ nm, emissão de barreira $\lambda = 680$ nm) na objetiva de 40x.

Os nucleóides foram classificados de acordo com o tamanho da “cauda” em Classe 0 (nenhum dano ou seja, nucleóides intactos, sem cauda), classe 1 (ligeiramente danificado, os nucleóides apresentam um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça), classe 2 (dano intermediário, os nucleóides apresentam caudas com tamanhos equivalentes a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça), classe 3 (dano elevado, os nucleóides apresentam caudas com tamanho equivalente a duas vezes o diâmetro da cabeça e 4 (dano máximo, os nucleóides apresentaram caudas com tamanho superior a três vezes o diâmetro da cabeça altamente danificado) (Figura 3). As lâminas foram codificadas e sempre analisadas pela mesma pessoa. O índice de células com cometa foi determinado pelo cálculo do número de células com cometa multiplicado pela classe correspondente (0, 1, 2, 3 e 4). As células foram classificadas de acordo com o observado na Figura 3.



Figura 3 Classes de danos de DNA observadas no ensaio cometa de eritrócitos das brânquias de *A. altiparanae*.

Os procedimentos para realização da experimentação animal foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFGD, Protocolo n°. **005/2013**.

2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos do número médio de micronúcleo (MCN), índice mitótico (IM) e de anormalidades cromossômicas (IA) foram submetidos ao teste estatístico Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resultados. As médias foram transformadas ($\sqrt{x + 0,5}$) visando atender os pressupostos da análise de variância (normalidade de erros), entretanto, as médias originais foram mantidas para apresentação. Após a verificação da normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos a análise de variâncias pelo teste ANOVA e quando significativo comparou-se as médias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Para análise dos resultados do teste de ensaio de cometa foi calculado o total de células com cometas (classes 1, 2, 3, 4) para os 100 nucleóides analisados. O total de células com alteração de cada tratamento foi submetido ao teste estatístico Qui-Quadrado, para comparação dos resultados dos tratamentos com o controle negativo. Os resultados estatísticos foram analisados com auxílio dos programas SAS® (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) e BioEstat 4.0 (Ayres et al. 2005).

3.RESULTADOS

Nas amostras de água do córrego Curral de Arame não foram observadas alterações em relação a aspectos de odor e a cor. Alterações comportamentais nos peixes, como maior movimentação branquial, foram observadas quando estes foram colocados nos aquários com as amostras de água de P2 e P3.

A análise desses parâmetros possibilitou detectar que as amostras de água do córrego Curral de Arame, dentre os períodos coletados, apresentaram valores dentro do permitido, segundo CONAMA (357/2005), para P1, P2, P3 e P4, exceto para os valores relativos à condutividade elétrica, que apresentaram índices maiores que o permitido (maior que 100 uS/cm² - CONAMA), para o P1 deste córrego, indicando a presença de sais nesse local (Tabela 1).

Tabela 1 Análise físico-química das amostras de água dos pontos de coleta (1, 2, 3, 4) do córrego Curral de Arame durante, os meses de Janeiro à Outubro de 2013.

Parâmetros	Pontos de Coleta				Parâmetros Conama*
	1	2	3	4 [#]	
Temperatura da Água (°C)	24,5	24,8	28,6	27,6	Inferior a 40°C
pH	7,4	7,4	7,6	7,4	6,0 a 9,0
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	7,4	5,6	8,7	4,5	Não inferior a 4 mg L ⁻¹
Condutividade (uS/cm ²)	121,3*	96,8	85,7	88,3	Inferior à 100 uS/cm ²

*Resolução nº357 de 2005 do Conama

Os dados pluviométricos de Dourados (MS), baseados em mensurações meteorológicas realizadas pela Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados, MS em um

intervalo entre coletas (intervalo de 60 dias aproximadamente), permitiu destacar que o período de maio 2013 apresentou maiores valores de precipitação pluviométrica, o que sugere maiores interferências nesse período (Tabela 2)

Tabela 2: Dados de pluviosidade do município de Dourados (MS) nos períodos de coleta (2013).

Período de Coleta	Janeiro	Março	Maior	Agosto	Setembro	Novembro
Precipitação (mm)	2,55	6,25	8,24	2,74	2,96	4,75

3.1 Determinação de Metais

Os resultados referentes à determinação de metais estão representados na Tabela 3.

A determinação de metais das amostras de água coletadas no córrego Curral de Arame indicou que os valores encontrados foram maiores que os permitidos pela Resolução 357/05 do CONAMA para o Cd, Co, Pb e Ni, em todas as amostras coletadas para os P1, P2 e P3.

Os valores para o Cu, Fe, Mn estavam dentro da normalidade exigida, em todos os pontos de coleta analisados.

Os metais Zn e Cr foram mensurados, porém, nenhum destes apresentou valor acima do limite de detecção, portanto, não foram indicados na Tabela 3.

Para a análise dos valores relativos à quantidade de metais no P4, foi seguida a Resolução 396/2008 do CONAMA para classificação das águas subterrâneas. Sendo assim, o P4 também apresentou valores acima do permitido, apenas, para o Cd, nos períodos de amostragem, conforme classificado na resolução.

Tabela 3: Determinação de metais presentes nas amostras de água do córrego Curral de Arame durante os seis meses de coleta (Janeiro à Novembro 2013).

Compostos (mg L⁻¹)							
	Cobre (Cu)	Ferro (Fe)	Manganês (Mn)	Cadmio (Cd)	Cobalto (Co)	Chumbo (Pb)	Níquel (Ni)
Ponto 1	< LQ	0,651	0,026	0,071	0,280	0,486	0,236
Ponto 2	< LQ	1,464	0,092	0,085	0,405	0,518	0,263
Ponto 3	< LQ	1,610	0,115	0,510	0,303	0,441	0,316
Ponto 4	< LQ	< LQ	0,042	0,083	0,341	0,519	0,289
Parâmetros Conâma (357/2005)	0,013	5,0	0,5	0,01	0,2	0,033	0,025
Parâmetros Conâma* (396/2008)	2,0	0,3	0,1	0,005	-	0,01	0,02

Limite de Detecção: 0,007 mg L⁻¹ (Cu); 0,014 mg L⁻¹ (Fe); 0,005 mg L⁻¹ (Mn); 0,008 mg L⁻¹ (Cd); 0,021 mg L⁻¹ (Co); 0,060 mg L⁻¹ (Pb); 0,018 mg L⁻¹ (Ni). *Resolução referente à parâmetros para água subterrânea. **Negrito** índices maiores que o permitido, segundo a Legislação do CONAMA. – não apresenta valores de referência.

3.2 Análises de Compostos Orgânicos

Os resultados referentes às análises de compostos orgânicos presentes na água do córrego Curral de Arame indicaram que os tempos de retenção dos pesticidas foram de 4,84 minutos para o thiamethoxam e de 5,38 minutos para carbendazim. O tempo de retenção da oxitetraciclina foi de 4,19 minutos.

Nas amostras de água coletadas foi detectada, nos pontos amostrais do córrego Curral de Arame, a presença do antibiótico oxitetraciclina. No entanto, outros dois picos que não puderam ser identificados também foram detectados, sugerindo a presença de outros compostos não conhecidos na água deste córrego, como apresentado na Figura 4.

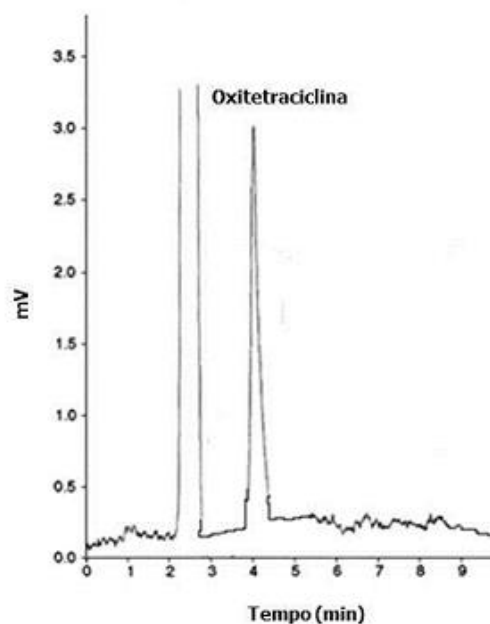


Figura 4 Cromatograma da oxitetraciclina de amostra de água coletada no córrego Curral de Arame.

As quantidades encontradas do antibiótico oxitetraciclina nos pontos de coleta de água do córrego Curral de Arame indicaram que a maior concentração desse composto foi encontrada no P3, seguido do P2 e P1, respectivamente (Tabela 4). Não foi detectada concentrações dos pesticidas, thiamethoxan e carbendazim na água deste córrego.

Tabela 4 Determinação de compostos orgânicos na água do córrego Curral de Arame nos diferentes pontos de coleta.

Compostos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Pontos de Coleta		
	1	2	3
Thiamethoxam	<LD	<LD	<LD
Carbendazim	<LD	<LD	<LD
Oxitetraciclina	51	53	89

Limite de detecção (LD) $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ (thiamethoxam); $0,36 \mu\text{g L}^{-1}$ (carbendazim); $15 \mu\text{g L}^{-1}$ (oxitetraciclina).
 Limite de quantificação (LQ) $1,23 \mu\text{g L}^{-1}$ (thiamethoxam); $1,20 \mu\text{g L}^{-1}$ (carbendazim); $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (oxitetraciclina).

3.3 Análises Microbiológicas

Coliformes Totais, Termotolerantes e *E.coli*

Os resultados das análises de coliformes indicando a presença de *E. coli* nas amostras de água do córrego Curral de Arame foram apresentadas na Figura 5.

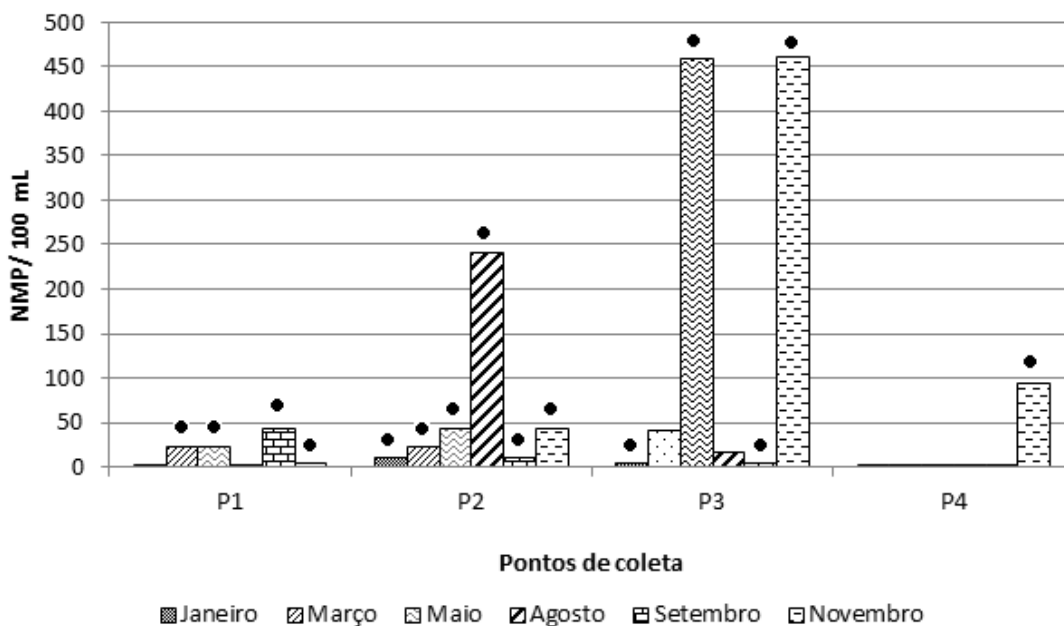


Figura 5 Resultado da análise de Coliformes Totais (NMP/100 mL) das seis coletas realizadas no Córrego Curral de Arame, nos pontos 1, 2 e 3. O símbolo (●) representa a presença de *Escherichia coli* no determinado ponto de coleta.

A pesquisa de coliformes e a presença de *Escherichia coli* indicaram que o P3 apresentou os maiores valores relativos para os coliformes (> 450 NMP/100 mL), seguido do P2 e P1, respectivamente. No entanto, a presença de *E. coli* foi mais influenciada nos pontos após o descarte de resíduos do distrito industriais P2 e P3, respectivamente, quando comparados com o P4, que apresentou *E. coli* somente na coleta de novembro 2013 (Figura 5).

Pesquisa de *Salmonella sp.*

A pesquisa com *Salmonella spp.* foi realizada em todas as coletas, porém não foram encontrados isolados desse organismo no curso d'água estudado.

Pesquisa de *Pseudomonas sp.*

Os resultados referentes à pesquisa de *Pseudomonas sp.* nas amostras de água do córrego Curral de Arame encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 Isolados de *Pseudomonas spp.* nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame, durante os meses de Janeiro à Outubro 2013.

Meses de Coleta	Pontos de Coleta			
	P1	P2	P3	P4
Janeiro			●	
Março	●	●	●	●
Maiio	●	●	●	
Agosto	●	●	●	
Setembro			●	●
Novembro	●	●	●	
Numero de isolados	4	4	6	2

- Presença de *Pseudomonas spp.* nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame.

A presença de *Pseudomonas spp.* nas amostras de água do córrego Curral de Arame foi bem evidente, principalmente no P3, que indicou a presença da mesma nos seis meses coletados. O mês que apresentou a maior contaminação por *Pseudomonas spp.* foi o mês de março, indicando contaminação nos 3 pontos do córrego Curral de Arame e no P4 no tanque da UFGD.

3.4 Análises Biológicas

3.4.1 Bioensaios Vegetais

Citotoxicidade em *A. cepa*

Os resultados das análises estatísticas provenientes de dados referentes a índices mitóticos em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* indicaram diferença significativa entre os locais e os períodos de coleta (Tabela 6).

Tabela 6 Médias dos índices mitóticos (IM) de *A. cepa* durante os períodos de coleta (Janeiro/2013 à Novembro/2013) e media total nos pontos de coleta nos quatro diferentes tratamentos (P1, P2, P3 e P4 e controle positivo (CP)).

Média do índice mitótico nos pontos de coleta							
	Janeiro	Março	Maió	Agosto	Setembro	Novembro	Média total (Pontos)
P1	7,10 a	5,72 a	6,09 a	5,52 ab	4,33 ab	4,09 b	5,47 a
P2	3,78 b	4,60 a	5,62 a	3,83 ab	5,84 a	3,92 b	4,60 a
P3	5,55 ab	6,07 a	5,16 a	5,28 ab	4,46 ab	4,19 b	5,12 a
P4	4,35 ab	5,82 a	4,55 a	6,21 a	6,21 a	7,56 a	5,78 a
CP	4,74 ab	0,07 b	4,53 a	1,42 b	1,42 b	0,85 c	1,74 b

Média do índice mitótico seguida pela mesma letra minúscula em determinada linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. Média total dos pontos e dos meses seguida pela mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. Coluna diferença estatística entre pontos de coleta, Linha diferença estatística entre os meses de coleta.

Em relação ao mês de janeiro/2013, o P1 e P2 apresentaram diferenças significativas entre si, quando comparados os IM em células de *A. cepa*. No mês de março/2013 todos os pontos de coleta foram estatisticamente significativos, em relação ao IM, comparados ao controle positivo (0,07). Para as coletas realizadas em maio, agosto e novembro 2013 não houve diferença significativa dos pontos de coleta com o controle positivo e com o controle (P4). No mês de setembro 2013 apenas os valores de P2 foram significativos em relação ao controle positivo (1,42).

Assim, em comparação ao controle positivo o P1 apresentou o maior índice observado (5,47), e o P2 os menores. As análises estatísticas indicaram que houve diferença dos pontos de coleta com o controle positivo, porém, não houve diferença, comparados ao controle (P4) (Tabela 6).

Índice de alterações cromossômicas em *A. cepa*

As médias dos índices de alterações cromossômicas, encontradas a partir da análise dos resultados, estão indicadas na Tabela 7.

Tabela 7 Médias dos índices de alterações (IAC) de *A. cepa* durante os períodos de coleta (Janeiro à Novembro de 2013) e media total nos quatro diferentes tratamentos (P1, P2, P3 e P4 e controle positivo (CP)).

Média de alterações cromossômicas nos pontos de coleta							
	Janeiro	Março	Maió	Agosto	Setembro	Novembro	Média total
	(pontos)						
P1	0,14 a	0,05 a	0,14 a	0,49 a	0,006 a	0,0 b	0,139 a
P2	0,0 b	0,0 a	0,05 a	0,08 a	0,08 a	0,0 b	0,036 ab
P3	0,036 b	0,01 a	0,04 a	0,24 a	0,06 a	0,018 ab	0,061 b
P4	0,006 b	0,0 a	0,0 a	0,05 a	0,052 a	0,05 a	0,027 b
CP	0,032 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,012 b	0,007 b

Média dos índices de alterações nos períodos de coleta seguida pela mesma letra minúscula em determinada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. Média total dos pontos e dos meses seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Nas coletas de janeiro/2013 o P1 apresentou o maior IAC estatisticamente diferente dos outros pontos de coleta e dos controles positivo e P4. Em novembro/2013 os P1 e P2 não apresentaram IAC diferindo estatisticamente do P4. Nos meses de março, maio, agosto e setembro de 2013 não houve diferença estatística para os pontos de coleta e controles positivo e P4.

Em relação aos pontos de coleta, o P1 apresentou maiores índices de alterações analisadas (0,73), em seguida o P3 (0,64), P2 (0,59) e o P4 (0,58) em relação aos índices encontrados no controle positivo (0,59). A partir da análise dos resultados foi observado que houve diferença do P2 em relação aos demais pontos de coleta, exceto comparados ao P3 (Tabela 7).

As alterações cromossômicas mais comumente observadas em sementes de *A. cepa*, nos diversos pontos analisados, foram as alterações genotóxicas como pontes

cromossômicas, perdas cromossômicas, C-metáfases, aderências cromossômicas e multipolaridades (Tabela 8) Além dessas, foram encontradas, também, alterações mutagênicas como micronúcleos e quebras cromossômicas.

As alterações cromossômicas mais observadas nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame foram as genotóxicas c-metáfases, aderências, pontes e perdas cromossômicas. O período que apresentou o maior número total de células com alterações cromossômicas foi observado em agosto/2013, apresentando diferenças significativas para P1 do córrego Curral de Arame e para o ponto controle (P4), comparados com o controle positivo (CP).

Os outros meses de coleta janeiro, março, maio, setembro e novembro não apresentaram diferenças significativas no TCA, em relação ao controle. No entanto, o ponto que apresentou maior quantidade de células com alteração foi P1 do córrego Curral de Arame.

Tabela 8 Frequência de células de *A. cepa* com alterações cromossômicas derivados de contaminantes presentes nos pontos de coleta do Córrego Curral de durante os períodos de Janeiro à Novembro de 2013.

	Janeiro					Março					Maio					Agosto					Setembro					Novembro				
	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP	P1	P2	P3	P4	CP
MCN	0,0	0,0	0,2	0,0	1,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,2	1,2	0,0	0,0	10,8	0,6	6,8	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
BN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
PC	0,2	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,0	0,6	0,0	0,0	1,0	0,8	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
CM	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C-M	2,2	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
AC	1,2	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,4	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4
QC	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
PC	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	1,4	1,2	0,6	0,2	0,0	0,2	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
CPO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
TCA	4,6	0,0	0,8	0,2	1,0	1,6	0,0	0,6	0,0	0,0	4,4	1,8	1,4	0,0	0,0	15,2*	2,6	7,4*	1,6	0,0	0,2	2,2	0,2	1,6	0,0	0,0	0,0	0,6	1,6	0,4

MCN micronúcleos; BN broto nuclear; PC ponte cromossômica; CM célula multipolar; C-M c-metáfase, AC aderência cromossômica; QC quebra cromossômica; PC perda cromossômica; CP célula poliploide; TCA total de células com alterações cromossômicas; IA índice de alterações cromossômicas (número de células com alteração/número de células contadas*100); P1 ponto 1; P2 ponto 2; P3 ponto 3; P4 controle negativo; CP controle positivo. *estatisticamente diferente do controle positivo pelo teste Qui-Quadrado.

3.4.2 Bioensaios Animais

Teste de Micronúcleo Písceo em *A. altiparanae*

A partir da análise da frequência de micronúcleos nos eritrócitos de *A. altiparanae* foi possível observar que houve diferença estatística entre os locais de coleta e os períodos coletados, sendo que as médias encontradas a partir da análise dos resultados estão indicadas na Tabela 9.

Tabela 9 Médias do número de micronúcleo (MCN) em eritrócitos de *A. altiparanae* observadas durante os períodos de coleta (janeiro à novembro de 2013) e media total nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4).

Média do número de micronúcleos nos pontos de coleta							
	Janeiro	Março	Maió	Agosto	Setembro	Novembro	Média total (Pontos)
P1	8,20 b	1,00 a	8,20 a	6,20 b	12,00 ab	8,00 ab	7,26 bc
P2	12,0 a	1,00 a	15,20 a	15,80 a	15,40 a	12,80 ab	12,03 ab
P3	1,80 c	1,00 a	7,60 a	17,00 a	15,40 a	15,00 a	9,63 b
P4	3,40 c	1,00 a	6,20 a	7,20 b	5,60 b	6,80 b	5,03 c

Média de micronúcleos nos períodos de coleta seguida pela mesma letra minúscula em determinada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. Média total dos pontos e dos meses seguida pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. Coluna diferença estatística entre os pontos de coleta, Linha diferença estatística entre os meses de coleta.

No mês de janeiro/2013, o P1 e P2, o apresentaram diferenças significativas na quantidade de eritrócitos com micronúcleo, em relação ao P3 e ao controle (P4). Em agosto/2013 os valores apresentados para o P3 (17,0) e P2 (15,8) foram maiores estatisticamente e diferente do P1 (6,20) e do P4 (7,20). Em novembro, apenas, o P3 apresentou diferenças significativas em comparação ao P4. Para as coletas realizadas em

março, maio e setembro de 2013 não houve diferença significativa dos índices de micronúcleos nos eritrócitos de *A. altiparanae*, entre os pontos de coleta (Tabela 9).

O ponto que apresentou, em média, a maior frequência significativa de eritrócitos com micronúcleos foi o P2 (12,03), seguido do P3 (9,63), em relação ao P4 (5,03). O P1 apresentou o menor índice observado (7,26), porém, não foi estatisticamente diferente do controle (P4) (Tabela 9).

Teste de Ensaio do Cometa em *A. altiparanae*

A utilização da técnica de ensaio de cometa permitiu detectar danos ao DNA dos *A. altiparanae* expostos às amostras de água do córrego Curral de Arame, sendo o P3 que apresentou maior índice total de células com cometa, seguido do P2 quando comparados com o controle P4. O ponto que apresentou menor índice de células danificadas foi o P1 (Tabela 10).

Os resultados referentes às células danificadas (número de cometas x número da classe correspondente) indicaram que no mês de janeiro e outubro houve diferença entre os pontos de coleta (P1, P2 e P3), em relação ao P4, mas, apenas, o P3 apresentou diferenças significativas com os outros pontos de coleta. No mês de março, o P3 apresentou diferença significativa quando comparado ao P4 e aos demais pontos do córrego Curral de Arame. Em agosto houve apenas diferenças significativas do P3 comparado ao P1. No período do mês de setembro e novembro, apenas o P1 e P2 apresentaram valores significativos em relação ao P4, sendo que os valores para o P3 no mês de setembro só foram significativos, quando comparados aos P1 e P2. Em novembro, o P3 não apresentou diferenças significativas.

Os resultados referentes ao número total de células com cometa, indicaram que os pontos de coleta no córrego Curral de Arame (P1, P2, P3) foram estatisticamente diferentes, quando comparados ao P4 no mês de janeiro 2013, sendo o P3 diferente do P1 e P2. Em setembro, apenas, o P2 apresentou diferenças significativas em relação ao P4. O restante dos meses coletados (março, maio, agosto e outubro de 2013) não apresentaram valores significativos.

Tabela 10 Média das diferentes classes de cometa observadas em eritrócitos de *A. altiparanae* durante os períodos de Janeiro à Novembro de 2013 nos quatro pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4).

	Classes de cometa							
	TCA	CL 0	CL 1	CL 2	CL 3	CL 4	CS	
Janeiro	P1	64,8 *	44,0	52,6	10,6	1,6	0,0	78,6 *
	P2	50,4 *	39,4	53,8	2,2	0,4	0,0	59,4 *
	P3	85,4*,**,***	47,8	58,0	25,4	2,0	0,0	114,8*,**,***
	P4	15,4	85,2	12,6	2,0	0,8	0,0	19,0
Março	P1	88,2	22,0	78,6	8,2	1,0	0,0	99,6
	P2	88,0	20,0	57,0	28,5	2,4	0,0	121,5
	P3	97,4	13,2	42,2	37,8	16,8	0,6	170,6*,**,***
	P4	84,0	19,4	73,4	9,6	1,0	0,6	95,6
Maió	P1	87,6	26,4	64,4	21,6	1,4	0,2	112,6
	P2	79,8	24,0	55,2	18,4	1,6	0,0	96,8
	P3	75,4	31,4	50,0	16,0	6,0	3,4	113,6
	P4	83,2	20,0	52,4	24,6	6,2	0,0	120,2
Agosto	P1	72,4	29,2	40,0	28,4	4,0	0,6	108,8
	P2	76,2	18,6	46,2	24,4	5,6	0,6	111,8
	P3	65,4	36,6	48,6	15,4	1,4	0,6	83,6**
	P4	71,0	47,2	49,2	19,4	2,4	0,6	95,2
Setembro	P1	86,2	20,8	34,4	26,8	21,4	1,6	158,0*
	P2	101,2*	19,8	25,2	29,0	26,8	0,4	165,2*
	P3	81,2	31,4	39,4	22,0	11,6	0,6	118,2**,***
	P4	66,0	35,2	42,0	20,2	3,80	0,6	93,8
Novembro	P1	98,8	9,6	34,4	26,8	21,4	1,6	189,0*
	P2	89,6	19,8	25,2	29,0	26,8	0,4	180,2*
	P3	84,4	31,4	39,4	22,0	11,6	0,4	157,6
	P4	81,4	35,2	42,0	20,2	3,8	0,4	128,8

CL 0 sem danos, CL 1 ligeiramente danificado, CL 2 danificado, CL 3 e 4 altamente danificado, TCA total de células com cometa (classes 1, 2, 3 e 4), CS cálculo de células danificadas (número de cometas x número da classe correspondente). * estatisticamente diferente em comparação com P4; ** estatisticamente diferente em relação ao P1; *** estatisticamente diferente em relação ao P2; **** estatisticamente diferente em relação ao P3.

3.5 FONTES DA VARIAÇÃO

As fontes de variação e os, respectivos, quadrados médios de eritrócitos de *A. altiparanae* com micronúcleos e índices mitóticos e de alterações cromossômicas estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 Fontes da variação, graus de liberdade e quadrados médios referente ao número de micronúcleos de *A. altiparanae* e para os índices mitótico e alterações cromossômicas em *A. cepa*.

Causas da variação	Grau de liberdade			Média dos quadrados		
	MCN	IM	IA	MCN	IM	IA
Coletas	3	4	4	6,64***	6,21***	0,18***
Pontos	5	5	5	0,27NS	0,71***	0,021 NS
Coletas * Pontos	14	19	19	1,70***	0,83***	0,070***
CV (%)	20,19	17,52	26,14			
R ²	0,77	0,67	0,49			

NS não significativo ($p > 0,5$), CV coeficiente de variação, MCN micronúcleos, IM índice mitótico, IA índice de alterações cromossômicas. *** $p < 0,001$ NS não significativo.

As médias de micronúcleos foram influenciadas pela época e pela fonte de variação dos pontos de coleta, porém, não foi influenciada pela interação entre elas. Já os índices de divisão celular foram influenciados pelas duas fontes de variação, além da interação entre esses dois fatores. Os índices de alterações não foram influenciados por nenhuma dessas fontes.

4. DISCUSSÃO

No Brasil a utilização de produtos químicos nas indústrias, agricultura e pecuária, ainda não segue padrões rigorosos de controle (Souto et al. 2013), acarretando em prejuízos ao meio ambiente e aos organismos vivos. Dessa forma, é importante a utilização de ferramentas que auxiliem nos planos de controle para qualidade de água, como os testes de biomonitoramento.

. As análises químicas, físico-químicas e os biotestes com vegetais e animais, realizados nesse trabalho, indicaram a presença de substâncias tóxicas com efeitos nos seres vivos, corroborando com as pesquisas similares realizadas por Christofolletti (2008) e Duarte et al. (2012), onde os autores detectaram a presença de substâncias tóxicas nos ambientes naturais, com efeitos nos organismos, reforçando a eficiência da utilização de análises químicas em conjunto com as análises biológicas.

A cor e o odor de amostra de água estão relacionados com a presença, acima do permitido, de sólidos totais dissolvidos nesses ambientes, associados com a quantidade de matéria orgânica ou inorgânica em estado coloidal (Cetesb 2010). De acordo com a classificação das águas deste córrego, segundo a Resolução do CONAMA 357/2005, nos seis meses coletados, não houve alterações visuais (cor, odor), significativas, para a água do córrego Curral de Arame, não apresentando valores acima do permitido para os sólidos totais na água. O P3, localizado próximo às culturas e criações de animais, apresentou as maiores interferências, em relação ao aspecto da água no momento da coleta.

A condutividade elétrica de um corpo de água está relacionada com a capacidade da água em conduzir corrente elétrica. Níveis superiores à 100 us/cm^2 em uma amostra de água, permite dizer que o ambiente estudado está impactado, representando uma medida indireta da concentração de poluentes (Duarte et al. 2012). Valores maiores que 50 us/cm^2 já indicam a existência de contaminação por esgotos domésticos, fertilizantes do solo, insumos agrícolas e efluentes industriais descartados na água (Cetesb 2014) As análises físico-químicas das amostras coletadas no presente estudo indicaram que os índices de condutividade elétrica foram maiores que 100 us/cm^2 , para os três pontos no córrego, sendo que o P2 apresentou os maiores valores, pois este se encontra próximo a

áreas agrícolas de milho, soja e cana-de-açúcar que vêm influenciando a qualidade da água deste córrego.

Os níveis de oxigênio dissolvido indicam a capacidade de um corpo de água em manter vida aquática, sendo fator indispensável para os seres vivos, principalmente os peixes (Cetesb 2010). De acordo com o CONAMA 357/2005, a concentração de oxigênio dissolvido não deve ser inferior à 4 mg L^{-1} , pois acaba comprometendo a saúde dos peixes e de toda biota aquática associada. Os índices encontrados na água do córrego Curral de Arame estavam dentro do permitido por essa resolução, no entanto, os valores apresentados foram superiores à 10 mg L^{-1} , caracterizando situação de supersaturação, devido às altas concentrações de matéria orgânica, que podem estar presentes nesse ambiente, conforme descrito pela Agência Nacional das Águas – ANA (2009).

Os metais destacam-se como mais representativos contaminantes químicos, devido à sua toxicidade e persistência nos ambientes aquáticos e são introduzidos no meio ambiente por meio das atividades industriais, agrícolas e urbanas (Froner 2012). Os elementos químicos encontrados em quantidades acima das permitidas pela Resolução do CONAMA 357/2005, em todos os pontos coletados na água do córrego Curral de Arame (P1, P2 e P3), foram Cd, Ni, Co e Pb. De acordo com trabalhos realizados por Caritá (2010) esses metais são considerados tóxicos para microrganismos e plantas quando presentes em concentrações elevadas.

O Cd e o Pb são elementos químicos muito utilizados em estudos ambientais, devido seu potencial tóxico, larga distribuição no ambiente, longo período de meia-vida e toxicidade elevado por não desempenhar função nutricional ou bioquímica nos microrganismos, plantas e animais (Dall’Agnese 2011).

As principais fontes de contaminação por Cd são produção de pilhas, de agroquímicos (insumos) e incineração de lixo urbano, que aumenta a contaminação dos ambientes aquáticos. No córrego Curral de Arame, as concentrações do Cd no P3, foram cinco vezes maiores (0,510) que os outros pontos de coleta, indicando alto grau de contaminação desse ambiente, pois o mesmo se encontra próximo a culturas

temporárias (cana-de-açúcar, milho), que possivelmente foi afetado pela lixiviação de fertilizantes para o córrego.

O Pb é metal não essencial, altamente tóxico para os organismos da biota aquática, sendo um dos metais mais utilizados na indústria, principalmente de baterias elétricas (Perreira 2004; Lemos et al. 2008). As concentrações desse metal foram maiores que o permitido pelo CONAMA (357/2005), para os três pontos amostrais do córrego Curral de Arame, apresentando os maiores índices no P2, local mais afetado pela plantação de culturas da região. Esse composto é, comumente, utilizado como inseticidas na agricultura, podendo ocorrer, por meio do escoamento superficial do solo no córrego, que contribui para o aumento da contaminação desse ambiente.

Concentração elevada de Ni, também, foi encontrada nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame, pois o mesmo está constantemente ligado aos processos agrícolas, além de ser introduzido no ambiente pelo descarte de resíduos domésticos e industriais (Cetesb 2012). Esse metal é utilizado na agricultura para melhorar a resistências das plantas às doenças e combater a ferrugem foliar, além de ajudar no processo de fixação biológica de plantas leguminosas (soja, feijão, amendoim), sugerindo que o metal em questão foi encontrado nesse local do córrego, pois o mesmo se encontra em mediações onde as rotações de culturas são frequentes.

O Co é um metal indispensável aos organismos animais, porém em baixas concentrações. É encontrado nos ambientes aquáticos em pequenas quantidades e considerado tóxico para plantas e animais em concentrações superiores à 1 mg L^{-1} . Suas concentrações na água do córrego Curral de Arame não foram acima desse valor sugerido, no entanto, foram maiores que os parâmetros estipulados pela Resolução do CONAMA 357/2005, em todos os pontos de coleta, o que sugere a contaminação por esse metal no córrego.

As concentrações de metais encontradas nesse estudo podem estar relacionadas, também, com a presença de criadouros de animais, pois esses utilizam rações cujas formulações podem conter metais, e por isso, presentes no ambiente, devido aos dejetos animais (fezes, urina, restos de água, etc.) (Dall'Agnese 2011). O P3 do córrego Curral de Arame se encontra em região afetada pela criação de animais, em especial, por

aviculturas que se instalam nas margens do córrego, sem determinação de estudos de impactos ambientais, sugerindo que as concentrações de metais encontradas podem ter sido introduzidas por esses criadouros.

A pesquisa de bactérias de contaminação fecal é importante para identificar as possíveis interferências antrópicas encontradas no curso de água, pois estas estão presentes em grandes quantidades no intestino de animais de sangue quente, podendo, assim, indicar as possíveis interferências antrópicas exercidas nos ambientes aquáticos (Forner 2012). Os valores encontrados no córrego Curreal de Arame estavam dentro do permitido, segundo CONAMA 357/2005, ou seja, os valores apresentados foram menores que 1000 (NMP/100 mL), indicando que não há contaminação fecal nesse ambiente ou devido à presença de compostos (metais, antibióticos) que possivelmente afetaram no crescimento desses microrganismos.

No entanto, durante a maior parte das coletas realizadas detectou-se a presença de *E. coli*, mesmo em concentrações baixas de coliformes totais, principalmente, nos P2 e P3, indicando a contaminação de organismo patogênico, que causa doenças vinculadas a utilização ou consumo da água contaminada (Cesteb 2007), diretamente relacionado à presença de coliformes fecais. A contaminação por esses organismos está relacionada com a precipitação pluviométrica, visto que nos períodos onde a influência da chuva foi maior, houve maior número de coliformes e *E. coli* encontrados (maio e novembro 2013), pois possivelmente houve maior concentração de poluentes durante esses períodos.

A *Salmonella sp.* está entre os agentes patogênicos que mais causam doenças no trato intestinal dos indivíduos, por ser amplamente distribuída no ambiente (Chisté et al. 2007). Estudo realizado por Souza et al. (1992) relata que a interação entre Coliformes termotolerantes e *Salmonella sp.* se dá quando as concentrações de coliformes ultrapassam 2000/100 mL; o que não foi o caso desse estudo, pois os índices de coliformes estavam abaixo desse limite e, assim, não foram encontrados isolados de *Salmonella sp.* na água do córrego Curreal de Arame.

De acordo com Oliveira et al. (2006) a baixa incidência de *Salmonella sp.* pode estar relacionada às condições adversas do ambiente estudado, que impediram o

crescimento desses organismos e a pouca seletividade dos meios de cultivo que permitem o crescimento de outros organismos no mesmo meio.

As análises de cromatografia líquida detectaram a presença de antibiótico, muito utilizado na criação de animais (suínos, aves, peixes), conhecido como oxitetraciclina, que combate, principalmente, a *Salmonella sp.* Esse composto é do grupo das tetraciclinas, administrado em rações animais, utilizado para promover o crescimento na produção de gado, na produção avícola e como aditivos de alimento de peixe (Bila & Dezotti 2003). As concentrações desse composto na água do córrego Curral de Arame foi detectada em todos os pontos de coleta do córrego, sendo no P3 encontrado as maiores concentrações, devido sua localização aos arredores de criadouros de animais.

O carreamento desse composto até a água pode estar relacionado com o metabolismo dos organismos animais, pois os mesmos eliminam esses compostos na urina e nas fezes, deixando acumulados nos solos, até sofrerem lixiviação e serem transportados para os recursos hídricos (Regitano & Leal 2010). A presença desse composto na água, provavelmente inibiu o crescimento dos coliformes e das *salmonelas* nos pontos de coleta do córrego Curral de Arame, pois esse composto age inibindo patógenos que podem causar infecções, como o caso das aves e peixes comerciais (Maximiano et al. 2005).

Além disso, corrobora com esse dado o fato do crescimento das *Pseudomonas sp.* não ter sido inibido, pois bacilos Gram-negativos são capazes de resistir a ação de diversos tipos de antibióticos, causando inúmeras doenças nos seres humanos. Sua contaminação está ligada ao tempo de exposição ao ambiente (Oliveira et al. 2006; Vasconcelos & Calazans 2006), sendo que a presença de *Pseudomonas sp.* em amostras de água do córrego Curral de Arame foi detectada nos três pontos de coleta do córrego (P1, P2 e P3), sendo que o P3, próximo aos criadouros de animais, foi o local de maior concentração desse composto.

Além disso, as elevadas concentrações de metais encontradas nos pontos amostrais do córrego, principalmente, no P3, pode estar relacionada com a resistência bacteriana, pois alguns metais têm sido apontados como possíveis fatores na seleção bacteriana para resistência a antibióticos (Alonso et al. 2001; Serapicos 2008).

Os impactos de compostos químicos e orgânicos sob os organismos vivos têm sido muito estudados, pois estes podem interferir no crescimento e desenvolvimento dos vegetais acarretando em prejuízos para todos os níveis tróficos das cadeias biológicas (Carraschi 2010).

Esses impactos podem ser analisados através do potencial citotóxico, determinando pelo índice de divisão celular em células meristemáticas de *A. cepa*. Seus resultados estão relacionados com a inibição ou proliferação celular, pois muitas substâncias são capazes de provocar morte nas células de organismos vivos, de acordo com os níveis de poluição nos ambientes (Fernandes et al. 2007).

O índice de divisão celular nos ensaios de *A. cepa* na água do córrego Curral de Arame indicou que o P2 apresentou o menor índice mitótico observado em relação aos outros pontos de coleta e ao controle positivo, indicando a ação de agentes mutagênicos na água deste córrego, pois o mesmo apresenta grande influência da agricultura. Assim, sugere que as concentrações de metais (Cd, Ni, Co, Pb) acima do permitido, bem como os índices de antibiótico (oxitetraciclina), tenham influenciado nos processos de divisão celular.

De acordo com Fiskesjo (1988), os metais apresentam capacidade de inibir o processo de divisão celular das células vegetais, induzindo alterações cromossômicas e formando micronúcleos. A diminuição no índice de divisão celular e as alterações morfológicas nos cromossomos encontradas nas amostras de água desse córrego, corroboram com os estudos realizados por Hoshina (2005) e Matsumoto et al. (2006), pois os compostos químicos e orgânicos afetam o material genético das células, alterando o índice de divisão celular e causando alterações cromossômicas nas células meristemáticas de *A. cepa*.

Essas alterações cromossômicas podem ser decorrentes de alterações nos índices de divisão celular que comprometam o material genético da célula e, por isso, são chamadas de alterações mutagênicas ou potencialmente mutagênicas (Egito et al. 2007). As alterações cromossômicas mais encontradas, embora não tenham sido significativas em todos os períodos nesse estudo, foram as pontes, perdas, c-metáfase, aderência,

multipolaridade e até mesmo, micronúcleos nas amostras de água do P1, durante os períodos onde os índices pluviométricos foram menores (Agosto 2013).

A presença dessas alterações está relacionada com a inativação do fuso mitótico das células, decorrente de alterações na placa equatorial ou no processo de citocinese, decorrente da ação de agentes mutagênicos capazes de gerar anormalidades cromossômicas. Além disso, essas alterações, também, podem estar relacionadas com alterações nos microtúbulos citoplasmáticos, pois estas estruturas são importantes componentes do fuso mitótico e responsáveis pela segregação correta dos cromossomos (Hoshina 2005).

Essas alterações sugerem que a presença dos compostos encontrados na água (metais e antibiótico) sejam potencialmente genotóxicos para os organismos vivos, pois foi detectada através dos biotestes influências desses compostos mesmo em quantidades menores, como no caso do P1.

Os micronúcleos podem ser decorrentes de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que passaram pelo processo de divisão, porém, não são conduzidos para os polos celulares. Durante a telófase, esses fragmentos são envolvidos por membrana, formando um núcleo menor, disperso no citoplasma da célula, chamado de micronúcleo (Kirsch-Volders 2002). Alguns autores (Duarte et al. 2012; Ghisi & Oliveira 2013) sugerem que a indução de micronúcleos esteja relacionada com a presença de compostos químicos na água. Nesse estudo os índices de micronúcleo em eritrócitos de *A. altiparanae* indicaram que o P2, apresentou maiores valores comparados ao controle (P4), reforçando a ideia que os compostos agrícolas influenciam nos danos genéticos, pois neste ponto está bem evidenciado a plantação de culturas agrícolas.

Em estudo semelhante, Cardoso et al. (2006), através de ensaio com *Salmonella* e testes de micronúcleos em células V79, observaram que águas coletadas em rios contaminados por compostos orgânicos apresentaram potencial mutagênico. No entanto, durante ensaios isolados com esses compostos os resultados foram contrários, o que sugere que o potencial mutagênico da água esteja relacionado com ação conjunta de diferentes compostos. Isso evidencia para as concentrações de compostos de diferentes

naturezas (metais, antibiótico) encontradas na água do córrego Curral de Arame, sugerindo que os índices de micronúcleo encontrados estejam relacionados à presença desses compostos.

A incidência de micronúcleos também pode estar relacionada com as concentrações acima do permitido (CONAMA 357/2005) dos metais (Cd, Co, Pb e Ni) nas amostras de água do córrego Curral de arame, pois os mesmos podem agir induzindo quebras na fita simples do DNA, que leva a formação de micronúcleos. Estudos realizados por Matsumoto et al. (2006) mostraram que os metais são compostos genotóxicos capazes de induzir efeitos nos organismos vivos expostos à eles, aumentando a frequência de micronúcleos devido ao seu potencial em causar vários tipos de danos ao DNA.

Os agentes genotóxicos são capazes de produzir alterações na estrutura e na função do DNA acarretando em mutações, que levam a perda de sua integridade, causada por quebras e perdas de material genético (Caritá 2010). A presença significativa de classes de cometa (1, 2, 3, 4) indicou que essas quebras ocasionaram em danos ao DNA de *Astyanax altiparanae* sendo que o P3 apresentou maiores influências quando comparado aos demais pontos de coleta e ao ponto controle.

A utilização de peixes para avaliação de impacto ambiente de diversos ambientes naturais tem sido amplamente utilizada, pois os mesmos são capazes de responder a presença de substâncias tóxicas presente nos recursos hídricos, de forma rápida, dependendo das alterações ambientais (Christofolletti 2008). Isso se relaciona com a maior sensibilidade identificada nos peixes (*A. altiparanae*) para determinar os efeitos causados pelos compostos químicos e orgânicos encontrados nos locais onde a atividade agrícola é intensa e a criação de animais está presente.

A comparação das análises possibilitou identificar que os bioensaios vegetais e animais não se correlacionaram totalmente, pois os bioensaios vegetais indicaram que o ponto 2 (culturas agrícolas) apresentou as maiores influências comparadas aos outros pontos, enquanto que os bioensaios animais indicaram que o ponto 3 foi o mais impactado, se correlacionando com as análises químicas e de metais, que indicaram esse local como o de maior interferência antrópica.

As análises realizadas nesse estudo indicaram que as influências na quantidade de compostos orgânicos, nos danos mutagênicos e nas análises microbiológicas foram maiores nas estações secas, o que influenciou para maior potencialidade da indução de alterações cromossômicas, micronúcleos e danos ao DNA dos organismos expostos, evidência maiores influências da agricultura e da criação de animais durante esse período. Sendo assim, os estudos confirmaram que a água do córrego Curral de Arame está afetada pela presença de compostos químicos, necessitando de constante análise para a preservação desse recurso hídrico.

5 CONCLUSÃO

A partir das análises utilizadas nesse estudo (análises químicas, citogenéticas e microbiológicas) foi possível monitorar a qualidade de água do córrego Curral de Arame que é afetado pela contaminação de poluentes industriais e agrícolas, confirmando a potencialidade desse estudo como ferramenta auxiliar para controle da qualidade de água em diversos ambientes naturais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Águas – ANA (2009) Programa Nacional de Avaliação da Qualidade das Águas (PNQA) 222p.

Alonso A, Sánchez P, Martínez JL (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microb* 3:1-9.

American Public Health Association - APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21p.

Ayres M, Ayres MJ, Ayres DL, Santos SA (2005) BioEstat 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá 324p.

Bila DM, Dezotti M (2003) Fármacos no meio ambiente. *Quim Nova* 26:523-530.

Buss DF, Baptista DF, Nessimian JL (2003) Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade de água de rios. *Cad Saúde Pública* 19:465-473.

Cardoso CA, Dias HCT, Soares CPB, Martins SV (2006) Caracterização morfométrica da bacia hidrográfica do rio Debossan. *Rev Árvore* 30:241-248.

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

Carraschi SP (2010) Ecotoxicidade e eficácia da Oxitetraciclina e do Florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação, Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista

Carvalho AR, Schlittler FHM, Tornisielo VL (2000) Relações da atividade agropecuária com parâmetros físico químicos da água. *Quim Nova* 23:1-5.

Christofolletti CA (2008) Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Christofolletti CA, Pedro-Escher J, Fontanetti CS (2013) Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay, *Water Air Soil Pollut* 224-1523.

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB (2010) Variáveis de qualidade das águas.

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB (2012) Níquel e seus compostos. Fixa de informação toxicológica 3p.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2008) Resolução n° 396, 3 de Abril de 2011 11p.

Dall’Agnese TMF (2011) Avaliação das concentrações de metais pesados em dejetos líquidos de suínos, no município de capitão, RS, Brasil. Dissertação, Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul.

Duarte IM, Dias MC, David JAO, Matsumoto ST (2012) A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. *Braz J Biosc* 10:211-219.

Egito LCM, Medeiros MG, Batistuzzo de Medeiros SR, Agnez-Lima LF (2007) Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genet Mol Biol* 30:435-431.

Fernandes TCC (2005) Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest Biochem Physiol* 88:252–259.

Fiskesjo G (1988) The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat Res* 197:243–60.

Froner D (2012) Análise da qualidade e do potencial genotóxico das águas do arroio Luiz Rau no Município de Novo Hamburgo, RS. Dissertação, Universidade Feevale.

Ghisi NC, Oliveira EC (2013) Evidence of contamination in the main body of the public water supply of campo mourão-PR: An analysis from a bioindicator of environmental quality. *Sabios: Rev Saúde e Biol* 8:13-22.

Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Mcgregor JT, Newell GW, Salamone NF (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutat Res* 123: 61-118.

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

Krisch-volders M, Vanhauwaert A, Boeck MD (2002) Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutat Res* 504:137-148.

Kruger RA (2009) Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*, Dissertação, Programa de pós-graduação em Qualidade Ambiental, Centro Universitário Feevale.

Lemos JLS, Carlos MC, Faria YPMM, Santos RLC (2008) Revisão a cerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. *Série Tecnologia Ambiental* 43:11-66.

Master RN, Clark RB, Karlowsky JA, Ramirez J, Bordon JM (2011) Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009. *Int J Antimicrob* 38:291-295.

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MI, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA (2006) Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. *Genet. Mol. Biol* 29:148-158.

Maximiano AA, Fernandes RO, Nunes FP, Assis MP, Matos RV, Barbosa CGS, Oliveira-Filho EC (2005). Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Ciênc saúde coletiva* 10:483-491.

Oliveir MF, Pilz EB, Bellincanta GS, Limberger N, Macedo NT, Corção G, Germani JC, Van Der Sand ST (2006) Avaliação da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoa de estabilização através da identificação da população bacteriana. *Acta Scie Vet* 34:31-37.

Oliveira CPF (2003) Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am,

sobre o tabaqui, *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818), Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.

Pereira RS (2004) Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Ver Elet Recursos Hídricos 1:20-36.

Rádic S, Stipanicev D, Vujcic V, Rajcic MM (2009) The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. Sci Total Environ 408:1228-1233.

Regitano JB, Leal RMP (2010) Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. Rev Bras Ci Solo 34:601-616.

Rowny JG, Stewart JR (2012) Characterization of nonpoint source microbial contamination in an urbanizing watershed serving as a municipal water supply. Water Res 46:6143-6153.

Santos GC, Monteiro M (2004) Sistema orgânico de produção de alimentos. Alim Nutri 15:77-86.

Schmid W (1975) The micronucleus test. Mutat Res 31:9-15.

Serapicos ESAC (2008) Prevalência da resistência a antibióticos, metais e desinfetantes em isolados de *Staphylococcus* provenientes de uma etar municipal. Dissertação, Departamento de Química, Universidade do Porto.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR (2010) Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água. Ed Varela 4:624p.

Silva RRP, Pires OR, Grisolia CK (2011) Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. Toxicon 58:259-264.

Souto RMG, Corbi JJ, Jacobucci GB (2013) Diagnóstico Ambiental de Organoclorados em Sedimentos e Invertebrados Bentônicos de Bacias Hidrográficas do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Recursos Hídricos 19:143-153.

Vasconcelos U, Calazans GMT (2006) Antibiógramas de linhagens de *Pseudomonas aeruginosas* isoladas de diferentes ambientes aquáticos. Ver Patol Trop 35:241-244.

Ventura BC, Angelis DF, Marin-Morales MA (2008) Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (*Perciformes cichlidae*) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pestic Biochem Physiol 90:42-51.

Ventura CB (2004) Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Vogel EW (1982) Assessment of chemically-induced genotoxic events, in: Prospectives and Limitations, Leiden, The Netherlands. Universitaire Pers Leiden 24-29.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises realizadas foi possível contribuir com informações referentes à qualidade da água de ambientes aquáticos da região de Dourados/Mato Grosso do Sul (córregos Água Boa e Curral de Arame).

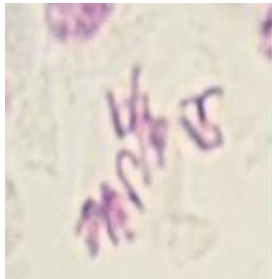
As análises químicas foram eficientes para determinar a quantidade de metais que estavam presentes na água destes córregos da Bacia do Rio Dourados, indicando que alguns metais estavam acima do permitido pela legislação vigente e são potenciais contaminantes que geram alterações celulares.

A pesquisa constatou a presença de compostos orgânicos (pesticida e antibiótico) na água desses córregos, sendo as análises de cromatografia líquida eficientes para determinar compostos tóxicos na água.

Os organismos utilizados (*A. cepa*, *A. altiparanae*) foram sensíveis para identificar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos causados por substâncias tóxicas presentes na água dos córregos Água Boa e Curral de Arame, sendo, considerados organismos-testes eficientes para pesquisa de poluição ambiental.

Assim, essa pesquisa pode contribuir com informações referentes à qualidade da água nos ambientes aquáticos naturais na região de Dourados/Mato Grosso do Sul, auxiliando nos planos de controle e qualidade de água de córregos pertencentes à Bacia do Rio Dourados na cidade de Dourados/MS

ANEXO I - FOTOS DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM *ALLIUM* CEPA



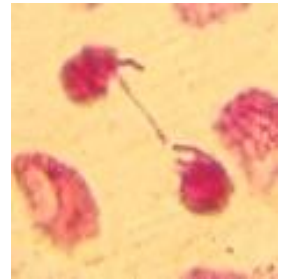
A



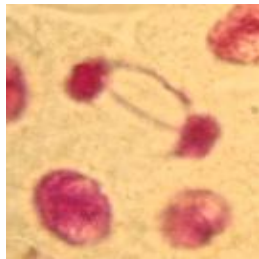
B



C



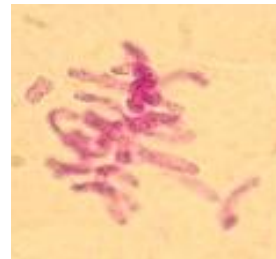
D



E



F



G



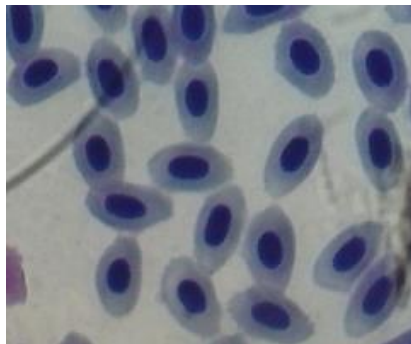
H



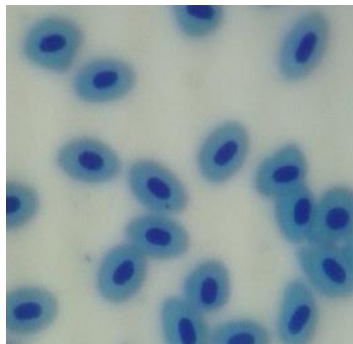
I

A – Metáfase com perda cromossômica; **B e C** – Anáfase Multipolar; **D e E** – Telófase com ponte cromossômica; **F** – Telófase com quebra cromossômica; **G** – Metáfase com perda e quebra cromossômica; **H** – Prófase com perda cromossômica. **I** – C-metáfase

FOTOS DE MICRONUCLEOS EM ERITRÓCITOS DE *Astianax altiparane*



A



B

A – Eritrócitos sanguíneos normais de *A. altiparane*; **B** – Eritrócitos sanguíneos de *A. altiparane* com micronúcleos ;