

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

JÉSSICA PEREIRA DE SOUZA

**Integração topográfica, química e biológica para
avaliação da qualidade da água de Pisciculturas.**

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

**DOURADOS, MS
JUNHO, 2017**

JÉSSICA PEREIRA DE SOUZA

**Integração topográfica, química e biológica para
avaliação da qualidade da água de Pisciculturas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexeia Barufatti 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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S729i Souza, Jéssica Pereira De

Integração topográfica, química e biológica para avaliação da qualidade da água de Pisciculturas / Jéssica Pereira De Souza -- Dourados: UFGD, 2017.
81f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Alexeia Baruffati Grisolia

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. Aquicultura. 2. bioensaios. 3. toxicidade aquática. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

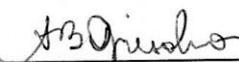
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



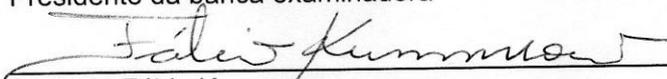
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Integração topográfica, química e biológica para avaliação da qualidade da água de pisciculturas”**, de autoria de **Jéssica Pereira de Souza**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



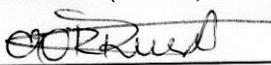
Prof.^a Dr.^a Alexeia Barufatti Grisolia
Presidente da banca examinadora



Prof. Dr. Fábio Kummrow
Membro Examinador (UNIFESP)



Prof.^a Dr.^a Kely Mari Pires de Oliveira
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Russo
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 28 de junho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e em especial:

À Deus por todas as bênçãos, força e sabedoria que me possibilitaram enfrentar todos os desafios durante esta caminhada.

À Universidade Federal da Grande Dourados/Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pelo suporte necessário durante o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e à FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul) pelo suporte financeiro a pesquisa.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Alexeia Baruffatti Grisolia, por ter acreditado na minha capacidade, por todo auxílio que me dedicaste e conhecimento adquirido durante sua orientação.

Aos Professores Doutores Kelly Mari Pires de Oliveira, Fábio Kummrow, Valter Aragão do Nascimento, Lilian Silvia Cândido, Yzel Rondon Suárez e Cassiana Carolina Montagner Raimundo por toda atenção e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório, em especial aos meus amigos Bruno do Amaral Crispim e Juliana Caroline Vivian Spósito, e, à Fabiane Gomes da Silva, Lucilene Finoto Viana e Julio César Jut Solórzano por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido, José Leandro e aos meus pais, José e Maria, pela ajuda e incentivos durante todos os momentos difíceis. E, à minha filha Maria Júlia por todos os momentos de alegria que também me deram força durante esta caminhada.

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1- Validação do método, série ICAP 6000-Duo, ThermoScientific, nebulização pneumática. Elementos com comprimentos de onda (nm) e Linearidade (R2).....	44
Tabela 2- Parâmetros experimentais de LC-MS/MS selecionados para cada composto	46
Tabela 3- Índice Mitótico (IM), Índice de morte celular (IMC), Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de mutagenicidade (IMT) em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , e, número médio de Células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS), Células com cometa (TCA), Índice de genotoxicidade (IG), número médio de Micronúcleos (MCN) em <i>Astyanax lacustris</i> em cada ponto de coleta nas pisciculturas no inverno.	50
Tabela 4- Índice Mitótico (IM), Índice de morte celular (IMC), Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de mutagenicidade (IMT) em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , e, número médio de Células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS), Células com cometa (TCA), Índice de genotoxicidade (IG), número médio de Micronúcleos (MCN) em <i>Astyanax lacustris</i> em cada ponto de coleta nas pisciculturas no verão.....	52
Tabela 5- Índice Mitótico (IM), Índice de morte celular (IMC), Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de mutagenicidade (IMT) em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , e, número médio de Células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS), Células com cometa (TCA), Índice de genotoxicidade (IG), número médio de Micronúcleos (MCN) em <i>Astyanax lacustris</i> em cada ponto de coleta nas pisciculturas em períodos de inverno e verão.	54
Tabela 6- Resultados obtidos no teste de <i>Salmonella</i> /microsoma em razão de mutagenicidade (RM) para os pontos de coletadas duas pisciculturas com as linhagens TA98 e TA100 de <i>S. Typhimurium</i> na presença e ausência de ativação metabólica em período de inverno.	55
Tabela 7- Determinação de metais em água de pisciculturas e comparação com valores recomendados pelo CONAMA (resolução nº 357/2005) e EPA (United States Enviromental Protection Agency) para toxicidade aguda e crônica.....	56
Tabela 8 - Análise de contaminantes emergentes nas amostras de água das pisciculturas rio Dourados e Brilhante.....	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1-** Percentual da produção de peixes no Brasil distribuída por Grandes Regiões 12
- Figura 2** – Espécie *Astyanax lacustris* (lambari).. 17
- Figura 3** - Células de *Astyanax lacustris* com micronúcleo e alterações morfológicas nucleares, (A) Célula sem dano, (B) núcleo lobulado, (C) *blebbed* núcleo, (D) *notched* núcleo, (E) picnose, (F) núcleo vacuolizado, (G) citoplasma vacuolizado, (H) célula binucleada, (I) célula sem núcleo, (J) micronúcleo 19
- Figura 4** – Classificação de danos de acordo com o tamanho da cauda, avaliados pelo ensaio do cometa. A - célula sem dano. B - célula com leves danos. C - célula danificada. D - célula altamente danificada. 20
- Figura 5** - Célula exposta a metais e sua consequente apoptose resultante do estresse oxidativo. 23

CAPÍTULO II

- Figura 1-** Mapa de uso e ocupação do solo das pisciculturas Rio Dourados e Brilhante 48

Resumo

O desenvolvimento da piscicultura na região da Grande Dourados (MS) vem crescendo devido à disponibilidade de recursos hídricos e condições climáticas propícias ao avanço desta atividade. Grande parte da água captada para os tanques é proveniente de nascentes ou córregos, que estão localizados nas proximidades das pisciculturas e, posteriormente são descartadas em rios. Considerando que as propriedades de toxicidade da água captada e descartada na maioria das vezes não são avaliadas, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem tais condições. Diante do exposto, o trabalho objetivou avaliar a toxicidade da água de duas pisciculturas da região da Grande Dourados desde sua captação até o seu descarte. Para tanto, foram realizados testes com *Allium cepa*, ensaio do cometa e teste de micronúcleo (alterações morfológicas nucleares) em *Astyanax lacustris*, e teste de *Salmonella*/microsoma, além da avaliação de parâmetros físico-químicos, concentração de metais e contaminantes emergentes nas amostras de água, e elaboração de mapa topográfico. Os resultados referentes ao ensaio do cometa com *A. lacustris* e Teste de *Salmonella*/microsoma permitiram observar diferença entre locais de captação e descarte de água das pisciculturas. Os tanques de descarte de água apresentaram maiores alterações genéticas quando comparados aos tanques de captação de água. A toxicidade observada nas amostras de água pelos bioensaios utilizados pode ser resultante de compostos utilizados na agricultura e na própria atividade piscícola. Com relação aos períodos de coleta, foi evidenciada maior toxicidade no período do inverno, o que pode estar relacionado à taxa de pluviosidade. No entanto, com base nos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de avaliação da toxicidade da água de pisciculturas e a importância do tratamento de seus efluentes.

Palavras chave: Aquicultura, bioensaios, toxicidade aquática.

Abstract

The development of fish farming in the region of Great Dourados (MS) has been increasing due to the availability of water resources and climatic conditions conducive to the advance of this activity. Much of the water collected for the tanks comes from springs or streams, which are located in the vicinity of fish farms and are later discarded in rivers. Considering that the toxicity properties of the water abstracted and discarded most of the time are not evaluated, it is necessary to develop researches that evaluate such conditions. In view of the above, the objective of this work was to evaluate the water toxicity of two fish farms in the Great Dourados region from its capture to its disposal. For that, tests were carried out with *Allium cepa*, comet assay and micronucleus test (nuclear morphological changes) in *Astyanax lacustris*, and *Salmonella* / microsome test, as well as the evaluation of physico-chemical parameters, concentration of metals and emerging contaminants in samples of water, and elaboration of topographic map. The results concerning the comet test with *A. lacustris* and *Salmonella*/ microsome test allowed to observe differences between catchment locations and water discharge from fish farms. The water disposal tanks presented greater genetic alterations when compared to the water collection tanks. The toxicity observed in the water samples by the bioassays used may be the result of compounds used in agriculture and in the fish activity itself. Regarding the collection periods, greater toxicity was evidenced in the winter period, which may be related to the rainfall rate. However, based on the results obtained, it is evident the need to evaluate the toxicity of the water of fish farms and the importance of the treatment of their effluents.

Keywords: Aquaculture, bioassays, aquatic toxicity.

APRESENTAÇÃO

O presente estudo propõe gerar informações relacionadas à qualidade da água de pisciculturas por meio da utilização dos bioensaios Teste de *Allium cepa*, Ensaio com *A. lacustris*, e Teste de *Salmonella*/microsoma, que são escassas para a região da Grande Dourados. Em seguida, as informações geradas pelos diferentes modelos experimentais testados serão comparadas com dados físico-químicos, condições climáticas, análise de uso e ocupação do solo, concentração de metais e contaminantes emergentes nos locais monitorados.

O trabalho foi organizado em dois capítulos. No capítulo 1 foi elaborada revisão bibliográfica, de modo a possibilitar a compreensão dos conteúdos e análises apresentados na pesquisa. O capítulo 2 foi apresentado na forma de artigo de acordo com as normas da revista *Water, Air, & Soil Pollution*, descritas no Anexo I.

OBJETIVO GERAL

- Verificar a qualidade da água de dois sistemas produtivos de pisciculturas localizados na região da Grande Dourados desde sua captação até o descarte em períodos de inverno e verão, utilizando parâmetros topográficos, físicos, químicos e biológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o uso e ocupação do solo de pisciculturas da região da Grande Dourados;
- Avaliar parâmetros físico-químicos, condições ambientais, concentração de metais, contaminantes emergentes e toxicidade entre locais de captação e descarte de água de pisciculturas;
- Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da água de pisciculturas da região da Grande Dourados por meio da utilização dos bioensaios: Teste de *Allium cepa*, Teste de Micronúcleo Píscico e Alterações Morfológicas Nucleares, Ensaio do cometa, e Teste de Salmonella/microsoma;
- Relacionar parâmetros físico-químicos e condições ambientais com resultados de alterações genéticas oriundas dos diferentes ensaios realizados;
- Determinar e comparar a concentração de metais na água de pisciculturas com o permitido para águas de classe 2, pela lei CONAMA 357/2005 e EPA 2016 para toxicidade aguda e crônica;
- Determinar contaminantes emergentes em amostras de água de pisciculturas;
- Determinar a influência dos períodos de coleta (inverno e verão) com as alterações genéticas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VII
APRESENTAÇÃO	VIII
OBJETIVOS	IX
CAPÍTULO I	
Revisão Bibliográfica	
1 A Piscicultura: estado da arte	12
2 Piscicultura: qualidade da água e uso e ocupação do solo	14
3 Biomonitoramento da qualidade da água e Bioensaios	16
3.1 Bioensaio vegetal	18
3.1.2 Teste com <i>Allium cepa</i>	18
3.2 Bioensaios animais	18
3.2.1 Teste de Micronúcleo Písceo (TMP) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em <i>Astyanax sp.</i>	18
3.2.2 Ensaio do cometa	19
3.3 Teste de <i>Salmonella</i> /microsoma	21
4 Parâmetros físico-químicos da água em atividades piscícolas	22
5 Metais e contaminantes emergentes em ambientes aquáticos	22
Referências	26
CAPÍTULO II	
Integração topográfica, química e biológica para avaliação da qualidade da água de Pisciculturas	
Resumo	37
1 Introdução	38
2 Materiais e Métodos.....	39
2.1 Área de Estudo	39
2.2 Análise do uso e ocupação do solo	40
2.3 Avaliação das condições climáticas e coleta de água para as análises biológicas e mensuração de dados físico-químicos	40

2.4 Bioteste Vegetal / Teste de Citotoxicidade, Genotoxicidade Mutagenicidade em <i>Allium cepa</i>	40
2.5 Ensaio com <i>Astyanax lacustris</i>	41
2.5.1 Teste de Micronúcleo Písceoe Alterações Morfológicas Nucleares em <i>Astyanax lacustris</i>	41
2.5.2 Ensaio do cometa em <i>Astyanax lacustris</i>	41
2.6 Teste de <i>Salmonella</i> /microsoma	42
2.7 Coleta de água e Análises Químicas.....	43
2.7.1 Amostragem e determinação de metais em água	43
2.7.2 Determinação de contaminantes emergentes	44
2.8 Análise Estatística.....	47
3 Resultados.....	47
4 Discussão	57
5 Conclusão.....	61
Agradecimentos	61
Referências.....	61
Anexos	68

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1 A Piscicultura: estado da arte

A piscicultura torna possível o aproveitamento dos recursos hídricos, e, contribui com a criação de postos de trabalhos assalariados, incentivando o desenvolvimento econômico e social (SATOLANI et al. 2008).

No Brasil, a atividade piscícola teve início no século XVIII, mas começou a se destacar a partir de 1990 (BATISTA, 2013). Desde então, tal atividade vem adquirindo cada vez mais importância no Brasil. O crescimento da população e a mudança de hábitos alimentares tem incentivado o aumento do consumo de peixes no país (FIPERJ, 2017).

O Brasil conta com 5,5 milhões de hectares de águas doces, o que equivale a 8% da água doce disponível no planeta, e 8,4 mil Km de litoral, indicando assim sua potencialidade para a atividade de piscicultura (ALMEIDA e MENDES, 2015). Em 2013, a piscicultura brasileira produziu aproximadamente 392 mil toneladas, onde a região que mais contribuiu para o desenvolvimento da atividade foi a Centro-Oeste. A região Centro-Oeste produziu aproximadamente 105 mil toneladas de peixes, representando 26,8% (Figura 1) do total produzido no Brasil (IBGE, 2013).

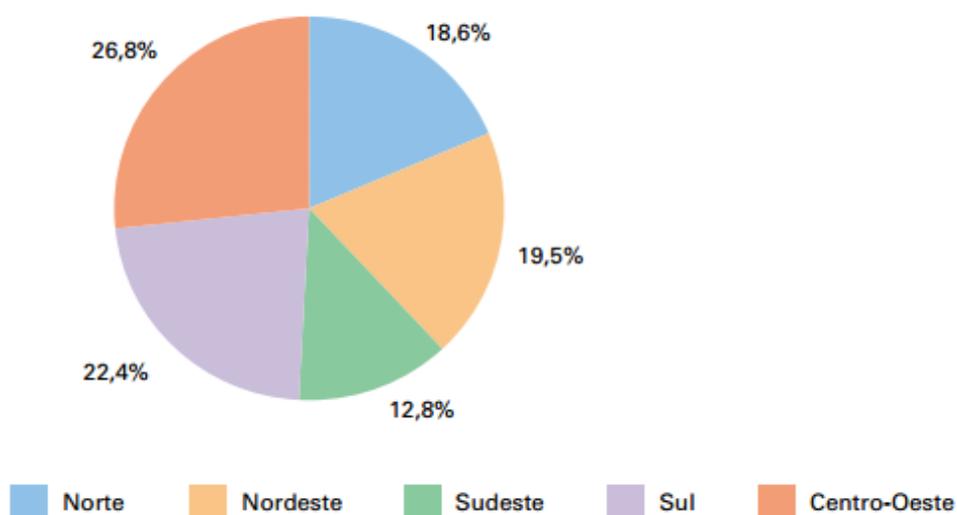


Figura 1- Percentual da produção de peixes no Brasil distribuída por Grandes Regiões. Fonte: adaptado de IBGE, 2013.

Na região Centro-Oeste, o Estado de Mato Grosso do Sul ocupa o 3º lugar na produção de peixes (IBGE, 2013). A atividade de piscicultura foi introduzida no Mato Grosso do Sul em 1996, pela lei nº 1653 (MATO GROSSO DO SUL, 1996). A piscicultura vem se destacando como rentável atividade no estado de Mato Grosso do Sul, que ocupa o 18º lugar na produção brasileira de peixes, produzindo 6.782.724 kg por ano (IBGE, 2015). O estado abriga abundante quantidade de peixes (EMBRAPA, 2010).

Além da prática da atividade de piscicultura, o estado de Mato Grosso do Sul possui estrutura para o fornecimento e produção de alevinos e engorda de peixes, e, produz insumos básicos de rações para peixes. Em virtude destas características e de sua grande quantidade de água doce e clima favorável o estado apresenta potencialidade para ampliação desta atividade, de modo a se destacar na produção de peixes em nível nacional (SATOLANI et al. 2008).

No estado de Mato Grosso do Sul, a região da Grande Dourados apresenta destaque na atividade de piscicultura (BATISTA, 2013). Essa região é responsável por 27,5% da produção do estado (SOUZA, 2012), e, se tornou um polo importante para o desenvolvimento de tal atividade por possuir características (clima, recursos hídricos, solo) adequadas ao desenvolvimento desta prática (EMBRAPA, 2010 e 2012).

Dessa forma, devido à importância da região da Grande Dourados para a produção de peixes no estado, investimentos governamentais tem sido direcionados a esta região, como forma de impulsionar o crescimento da atividade piscícola. A região possui fábrica de ração para peixes, equipamentos e medicamentos, fornecedores de adubos, organizações de produtores de peixes e pisciculturas especializadas na produção de alvinos e engorda (HISANO, 2017). Assim, devido a tais características, torna-se evidente a contribuição da região para o crescimento da produção de peixes no estado de Mato Grosso do Sul.

Na região da Grande Dourados é utilizada uma área de 1200 hectares de lâmina d'água para a atividade de piscicultura (SOUZA, 2012). Sendo que, 83,4% da água destinada aos tanques de piscicultura da região é captada de nascentes e, 16,6% de córregos. Esse fato indica a elevada demanda das pisciculturas por recursos hídricos (DOTTI et al. 2012).

2 Piscicultura: qualidade da água e uso e ocupação do solo

As águas destinadas à aquicultura e atividades piscícolas são classificadas como águas doces de classe 2, devendo seguir os padrões físico-químicos e microbiológicos para corpos de água doce destinados à pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo (CONAMA, 2005). Nesses locais, não deve ser verificado efeito tóxico na água. Para tanto, deve ser realizado ensaio padronizado ou outro método reconhecido cientificamente para avaliação da toxicidade da água (CONAMA, 2005).

Considerando que a maioria dos piscicultores da região da Grande Dourados utiliza água de nascentes para a prática desta atividade, supõe-se que a água utilizada seja de boa qualidade, mas nem sempre isso ocorre quando esta chega aos tanques de cultivo. Grande parte dos piscicultores não utiliza equipamentos que avaliem a qualidade da água nos tanques de cultivo, e isso dificulta o monitoramento da água que é captada para as pisciculturas e descartada aos rios (TEIXEIRA, 2007).

Durante a fase de implantação da piscicultura são gerados impactos que podem comprometer a qualidade da água, como a liberação de efluentes ricos em nutrientes, matéria orgânica e sólidos em suspensão, o que gera poluição e aumento da turbidez da água (DOTTI et al. 2012). Teixeira (2007) observou que menos de 10% das pisciculturas possuem tanque de decantação de seus efluentes, sendo que os 90% restantes retornam seus efluentes para os rios desprovidos de tratamento.

O lançamento de efluentes oriundos da atividade de piscicultura em corpos hídricos deve ser monitorado pelos responsáveis das fontes poluidoras (CONAMA, 2011). De acordo como a resolução nº 430 do CONAMA (2011), antes de serem descartados, os efluentes oriundos desta atividade devem ser submetidos a teste de ecotoxicidade, de modo a medir possível efeito tóxico agudo e crônico a organismos expostos.

Os efluentes provenientes de pisciculturas lançados aos rios sem o devido tratamento podem aumentar os níveis de contaminação dos corpos hídricos. Essa contaminação pode ser ocasionada pela ração utilizada para a alimentação dos peixes (SILVA, 2006). A ração adicionada diariamente aos tanques de cultivo pode ocasionar a eutrofização dos corpos hídricos (ABIMORAD et al. 2009).

Além disso, com a finalidade de prevenir e controlar doenças causadas pelo desenvolvimento de patógenos e parasitas nos tanques de cultivo de peixes, os piscicultores utilizam produtos químicos sem o devido controle. Dentre os produtos

utilizados, destacam-se: cloreto de sódio, permanganato de potássio, azul de metileno, formaldeído, verde malaquita, sulfato de cobre, triclorfon, e os antibióticos como tetraciclina, eritromicina e oxitetraciclina. Considerando que nas pisciculturas a água é retirada de corpos d'água e devolvida a eles após passagem pelos tanques de cultivo, tais produtos podem ser transportados e causar impactos em outros ambientes (MAXIMIANO et al. 2005).

No entanto, a água proveniente dos recursos hídricos captada para implantação dos tanques já pode chegar contaminada. Essa contaminação pode ser ocasionada pelo despejo de poluentes provenientes de atividades industriais, domésticas, agrícolas, e oriundas da criação de animais que pode diminuir a biodiversidade aquática e prejudicar a saúde humana que utiliza tais recursos para consumo (PINTO et al. 2009).

Substâncias oriundas da produção e despejo de resíduos no ambiente natural vêm crescendo progressivamente, tanto em áreas rurais quanto industriais, causando danos no material genético de muitos organismos vivos, prejudicando e alterando seus processos vitais (COSTA e MENK, 2012).

Outro aspecto importante para a avaliação da qualidade da água de pisciculturas é a análise de uso e ocupação do solo. Tal análise pode identificar as possíveis fontes de contaminação dos corpos hídricos responsáveis por comprometer a qualidade dos mesmos (FARIAS et al. 2013; SANTOS e VITAL, 2016).

O uso e ocupação do solo têm sido estudado por diversos autores como forma de identificar os possíveis impactos causados nas paisagens pelas atividades antrópicas (COELHO et al. 2014; NUNES e ROIG, 2015; MORAIS et al. 2016). Esses impactos podem ser monitorados pela análise de uso e da cobertura do solo utilizando-se informações das mudanças ocorridas nas paisagens no decorrer do tempo (COELHO et al. 2014).

A ocupação do solo por fragmentos florestais auxilia na manutenção e sustentação do ecossistema aquático, devido sua relação com processos hidrológicos (KAUANO e PASSOS, 2008; CASSIANO, 2013). Entretanto, a ocupação do solo de maneira inadequada pode ocasionar a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e conseqüentemente desequilibrar o ecossistema aquático (NUNES e ROIG, 2015).

A prática de atividades agrícolas e pecuárias pode ocasionar a diminuição de áreas ocupadas por fragmentos florestais. E, o escoamento superficial dos fertilizantes e

agrotóxicos utilizados na agricultura pode causar a contaminação dos corpos hídricos (COELHO et al. 2014; NUNES e ROIG, 2015). A prática da pecuária está associada à utilização de insumos de nutrientes para alimentação animal que podem ser escoados para os corpos hídricos, e conseqüentemente ocasionar a contaminação da água (VENDRAMINI et al. 2007). Dessa forma, monitorar o uso e a ocupação do solo torna-se recomendado na prevenção de impactos aos corpos hídricos e na avaliação da qualidade da água. Tal monitoramento auxilia no reconhecimento das atividades que causam poluição dos recursos hídricos para que medidas protetivas possam ser adotadas.

3 Biomonitoramento da qualidade da água e Bioensaios

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos são importantes ferramentas para o monitoramento da qualidade da água, pois possibilitam identificar a resposta destes em relação a um agente tóxico. Os testes de toxicidade são importantes para avaliação das concentrações seguras dos agentes químicos para os organismos vivos, bem como do risco ambiental ocasionado por contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação (COSTA et al. 2008).

Assim sendo, tornam-se necessárias pesquisas que avaliem os danos causados ao material genético de seres vivos expostos a contaminantes orgânicos e inorgânicos para o monitoramento ambiental. O uso de parâmetros biológicos para avaliação de tais danos possibilita determinar a influência das ações humanas sobre os corpos hídricos e conseqüentemente sobre os organismos vivos. Dessa forma, as informações geradas, subsidiam o biomonitoramento do uso da água e ações de manejo para conservação e preservação dos ambientes aquáticos (BUSS et al. 2003).

Os bioensaios animais, vegetais e microbiológicos mostram-se adequados para detectar efeitos adversos de substâncias sobre organismos, em diversas concentrações e em diferentes tempos de exposição. Em estudos de monitoramento ambiental vários testes podem ser aplicados, entre estes podem-se destacar os bioensaios utilizando *Allium cepa*, *Astyanax lacustris* e o teste de *Salmonella*/microsoma.

As plantas superiores são valiosas ferramentas no monitoramento de poluentes ambientais, sendo excelentes indicadoras de efeitos citogenéticos e mutagênicos de produtos químicos lançados ao ambiente (GRANT, 1994). Dentre os bioensaios vegetais para avaliação de toxicidade, destaca-se o ensaio com *Allium cepa*, por

apresentar alta sensibilidade a diversos toxicantes de interesse ambiental (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Entre as vantagens relativas ao uso de *A. cepa* como organismo-teste destaca-se sua eficácia na avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico por possuir características como cromossomos grandes e em número reduzido (FISKEJO, 1985).

Além de ensaios vegetais, testes utilizando peixes também são importantes na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias presentes em corpos hídricos (MASCHIO, 2009). Diversas espécies de peixes podem ser utilizadas para tais ensaios, dentre essas podemos destacar os lambaris (DOURADO et al. 2017). Uma das espécies de lambari utilizada em biensaaios é a *Astyanax lacustris* (Figura 2). Pesquisas recentes demonstraram que essa espécie possui ampla distribuição geográfica, sendo oportunista, generalista e apresentam importância ecológica e valor econômico. Além disso, sobrevivem em ambientes impactados e são tolerantes a condições adversas do meio (GALVAN, 2011; VIANA, 2013; VIANA et al. 2014; SÚAREZ et al. 2017). Resultados de pesquisas recentes demonstraram que sexo, tamanho e idade não influenciam na ocorrência de danos genéticos na espécie *A. lacustris* (VIANA et al. 2017).



Figura 2 – Espécie *Astyanax lacustris* (lambari). Fonte: Souza, 2015.

Outro teste muito utilizado na avaliação da qualidade da água é o teste de *Salmonella*/microssoma. Este teste tem sido aplicado em pesquisas de mutagênese ambiental, podendo ser utilizado para determinar a mutagenicidade de várias substâncias químicas e misturas complexas, tais como, ar, água e extratos de solo (TAGLIARI et al. 1999). Esse teste tem sido muito utilizado no Brasil para a avaliação do ambiente aquático e demonstrado eficiência na detecção de atividade mutagênica de toxicantes presentes em misturas complexas. (UMBUZEIRO et al. 2001; OLIVEIRA, 2007).

3.1 Bioensaio vegetal

3.1.2 Teste com *Allium cepa*

O teste *Allium cepa* foi introduzido por Levan, em 1938, após demonstrar que a colchicina poderia induzir distúrbios no fuso mitótico, causando a poliploidização de células meristemáticas das raízes dessa espécie. Tempos depois, o teste de *Allium cepa* foi aplicado na avaliação da toxicidade de água em estudos de monitoramento ambiental (FISKESJO, 1993).

Modelos experimentais utilizando *A. cepa* são aplicados em análises de qualidade da água e na identificação da ação de diferentes compostos mutagênicos (metais e contaminantes emergentes) encontrados no meio ambiente. Este teste caracteriza-se pela exposição das raízes a possíveis agentes mutagênicos que podem danificar o material genético das células e causar danos aos organismos expostos. *A. cepa* é um organismo-teste que permite a avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade de amostras de água (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Leme e Marin-Morales (2009) demonstraram que o teste de *A. cepa* mostrou-se uma ferramenta eficiente em estudos de monitoramento ambiental, obtendo bons resultados e sendo muito utilizado na avaliação de impactos provocados por xenobióticos. Devido à suas vantagens, inúmeros trabalhos com este organismo-teste têm sido realizados, de forma rápida e confiável na avaliação da contaminação ambiental (CHRISTOFOLETTI, 2008; GOMES et al. 2015; DOURADO et al. 2017).

3.2 Bioensaios animais

3.2.1 Teste de Micronúcleo Písceo (TMP) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em *Astyanax sp.*

Micronúcleos e alterações nucleares podem aparecer espontaneamente em eritrócitos de peixe (BOLOGNESI et al. 2006). O teste de micronúcleo foi desenvolvido por Boller e Schmid (1970). A formação de micronúcleo determina alterações mutagênicas nos cromossomos e danos ao fuso mitótico. E, pode ser induzida quando o dano causado por agentes químicos, físicos ou biológicos é capaz de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou pode levar a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) (SILVA et al. 2011).

Os eritrócitos de peixes são nucleados e os micronúcleos podem ser observados como resultado de atividade clastogênica (AL-SABTI e METCALFE, 1995). A

diferença significativa da resposta a agrotóxicos foi analisada por meio do teste de micronúcleo píceo com espécies de *Astyanax sp.* Seus dados mostraram a sensibilidade dos organismos testados, apresentando frequências significativas de micronúcleos e demonstrando que o teste é eficiente na determinação de substâncias mutagênicas (RAMSDORF et al. 2009).

Alterações nucleares passaram a ser levadas em consideração durante a costumeira análise de micronúcleos pela possível relação destas com processos de genotoxicidade, e, puderam ser observadas em células de peixe após exposição à água contaminada por substâncias químicas (SOUZA e FONTANELLI, 2006).

A exposição dos peixes à ação de agentes químicos tóxicos, encontrados no ambiente, pode levar à formação de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes (PALHARES e GRISOLIA, 2002; MATSUMOTO et al. 2006). Anormalidades como núcleo lobulado, *blebbed* núcleo, *notched* núcleo, picnose, núcleo vacuolizado, citoplasma vacuolizado, célula binucleada e célula sem núcleo podem indicar genotoxicidade em peixes (SOUZA e FONTANELLI, 2006). A Figura 3 representa células com micronúcleo e alterações morfológicas nucleares.

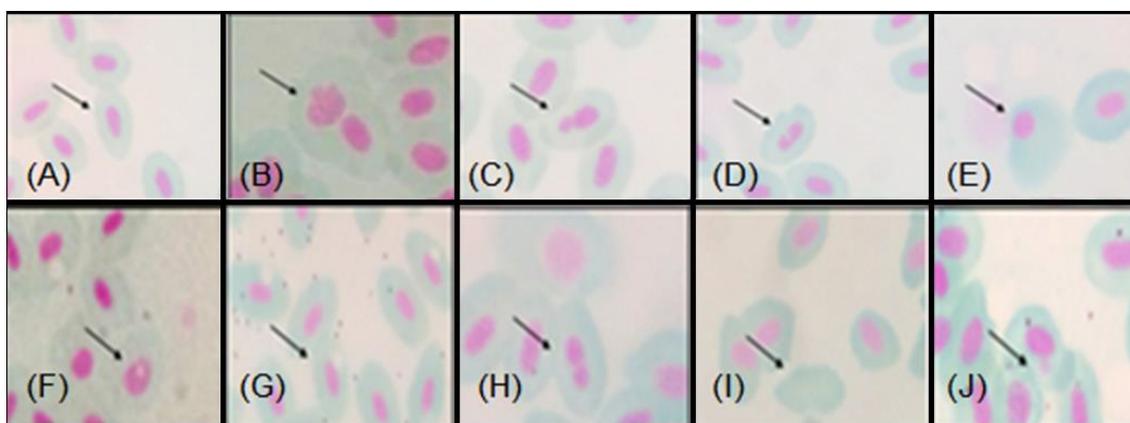


Figura 3 - Células de *Astyanax lacustris* com micronúcleo e alterações morfológicas nucleares, (A) Célula sem dano, (B) núcleo lobulado, (C) *blebbed* núcleo, (D) *notched* núcleo, (E) picnose, (F) núcleo vacuolizado, (G) citoplasma vacuolizado, (H) célula binucleada, (I) célula sem núcleo, (J) micronúcleo. Fonte: Spósito, 2016.

3.2.2 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa é um teste para avaliação de genotoxicidade que vem sendo empregado há mais de vinte anos. Este teste apresenta sensibilidade e versatilidade na medição de quebras de fitas simples e duplas de DNA (COLLINS et al. 2008). O ensaio

do cometa foi relatado pela primeira vez por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh et al. (1988).

O ensaio do cometa consiste na aplicação de corrente elétrica no núcleo das células, em lâminas com gel de agarose para se avaliar lesões no DNA (DI PAOLO, 2006). Nesta técnica, a corrente elétrica gera o transporte de fragmentos do DNA para fora dos núcleos em células com conteúdo nuclear lesionado (SANTOS et al. 2009).

O ensaio do cometa avalia os danos e reparos de DNA em células individuais (BRIANEZI et al. 2009). O dano ocorrido apresenta relação com a extensão do DNA que migrou para fora do núcleo (FAIRBAIRN et al. 1995). Para a avaliação do dano, a medida mais utilizada é realizada por meio da 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). Medidas sobre o tamanho da cauda (Figura 4) fornecem dados indiretos referentes ao estado do DNA na amostra (BRIANEZI et al. 2009).

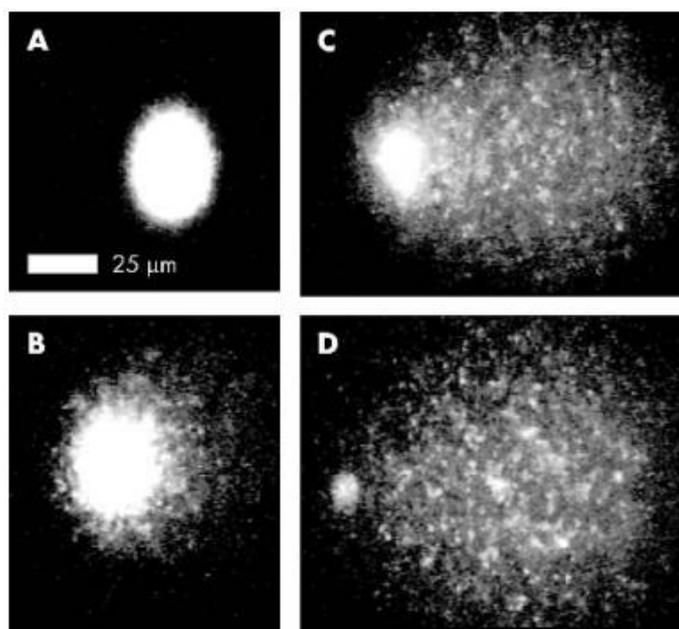


Figura 4 – Classificação de danos de acordo com o tamanho da cauda, avaliados pelo ensaio do cometa. A - célula sem dano. B - célula com leves danos. C - célula danificada. D - célula altamente danificada. Fonte: Lebailly et al. 2003, p. 913.

O ensaio do cometa demonstra utilidade para diferentes avaliações ambientais, por ser ferramenta indispensável em diversas áreas de pesquisa, como genética toxicológica e biomonitoramento ambiental (SILVA, 2007; SCHERER e STROHSCHOEN, 2013). Pode também ser empregado em epidemiologia molecular e biomonitoramento humano, e, avaliação da genotoxicidade de novos produtos químicos

(SCHOTTENFELD e BEEBE-DIMMER, 2006; BERTOLOZZO et al. 2010). Estudo realizado demonstrou a eficiência do ensaio do cometa na avaliação da genotoxicidade de amostras de água (BUCKER et al. 2006).

3.3 Teste de *Salmonella*/microssoma

O teste de *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames) foi desenvolvido por Bruce Ames no começo da década de 1970 (AMES, 1971). Este é um teste de mutação reversa bacteriana de curto prazo que pode detectar mutagenicidade em amostras ambientais. Tal mutagenicidade pode ser oriunda de substâncias químicas presentes nas amostras ambientais, responsáveis por induzir danos genéticos e posteriormente levar a mutações gênicas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

No teste de *Salmonella*/microssoma são utilizadas linhagens de *Salmonella* que dependem de histidina, quando estas linhagens são plaqueadas em meio deficiente em histidina, somente as bactérias revertentes à independência de histidina terão capacidade de formar colônias. Entretanto, quando adiciona-se uma substância mutagênica à placa observa-se o aumento no número de colônias revertentes por placa (MORTELMANS e ZEIGER, 2000). Para saber se uma substância é mutagênica pode ser realizado o cálculo de razão de mutagenicidade, que é a razão entre o número de revertentes por placa com a amostra testada e o número de revertentes do controle negativo. Uma substância é considerada mutagênica quando apresenta razão de mutagenicidade maior que 2,0 e tóxica quando apresenta razão de mutagenicidade menor que 0,7 (SBMCTA, 2004).

As linhagens mais recomendadas para a realização do teste de *Salmonella*/microssoma em amostras ambientais são a TA 98 (que detecta mutações causadoras de deslocamento do quadro de leitura) e a TA 100 (que detecta mutações pela substituição de pares de bases). Essas linhagens são eficientes na detecção de compostos mutagênicos (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; FRANÇA, 2006). O teste de *Salmonella*/microssoma tem apresentado características vantajosas como rapidez, sensibilidade e simplicidade. Tais vantagens possibilitaram que este teste seja muito utilizado na avaliação de amostras ambientais (KUMMROW et al, 2010).

O teste de Ames tem sido utilizado por vários autores na avaliação da atividade mutagênica em amostras de água (UMBUZEIRO et al. 2004; OLIVEIRA, 2007; UMBUZEIRO et al. 2010; SOUZA, 2014).

4 Parâmetros físico-químicos da água em atividades piscícolas

A avaliação da qualidade da água baseada em seus parâmetros físico-químicos torna-se de suma importância para a prática da atividade piscícola. A água, em condições inadequadas, pode causar prejuízos à saúde e, conseqüentemente, à sobrevivência dos peixes nos tanques de piscicultura (LEIRA et al. 2017).

O CONAMA (2005) por meio da resolução nº 357 de 17 de março de 2005, estabelece as condições físico-químicas de qualidade das águas destinadas à aquicultura e atividades de pesca.

Dentre os parâmetros físico-químicos a serem monitorados em água de pisciculturas, o teor de oxigênio dissolvido (O_2), o pH e a temperatura da água são variáveis cujo monitoramento é indispensável para a sobrevivência dos peixes (EMBRAPA, 2013).

O oxigênio dissolvido na água, imprescindível para a respiração dos peixes, oscila durante o dia devido a mudanças na taxa de luminosidade e seu baixo teor na água pode ser prejudicial aos peixes (EMBRAPA, 2016). A solubilidade do oxigênio na água pode variar em função da temperatura e da pressão atmosférica (LEIRA et al. 2017).

Além do oxigênio dissolvido, o acompanhamento do pH é importante na criação de peixes, pois indica se a água está ácida, básica ou neutra nos tanques de cultivo. Oscilações na faixa de pH da água podem ser prejudiciais ao desenvolvimento dos peixes (EMBRAPA, 2013; WAMBACH, 2012).

Outro parâmetro relacionado à boa qualidade da água em pisciculturas é a temperatura, que pode estar relacionada ao bom desenvolvimento dos peixes. A temperatura interna dos peixes oscila de acordo com a temperatura do ambiente ao qual estão inseridos. Dessa forma, seu metabolismo é determinado pela temperatura da água (REBOUÇAS et al. 2014). Sendo assim, torna-se relevante o monitoramento das condições físico-químicas da água de pisciculturas, de modo a evitar prejuízos à saúde, bem como a mortalidade de peixes.

5 Metais e contaminantes emergentes em ambientes aquáticos

Alguns metais fazem parte de vários processos fisiológicos em pequenas concentrações, sendo denominados elementos essenciais. Contudo, em altas

concentrações, alguns metais podem apresentar ação mutagênica, genotóxica e citotóxica contaminando ambientes aquáticos (FERREIRA et al. 2010; CHRISTOFOLETTI et al. 2013).

Os metais podem causar toxicidade nas células vivas por meio de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser ocasionado por desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a geração de antioxidantes como forma de desintoxicar os intermediários reativos ou corrigir os danos resultantes. A Figura 5 demonstra a exposição de uma célula à presença de metais, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a defesa por antioxidantes como o superóxido dismutase (SOD), glutatona (GSH), glutatona S-transferase (GST) e Catalase. O desequilíbrio entre a produção de ROS e a defesa pelos antioxidantes pode resultar em estresse oxidativo e consequente apoptose da célula (JAISHANKAR et al. 2014).

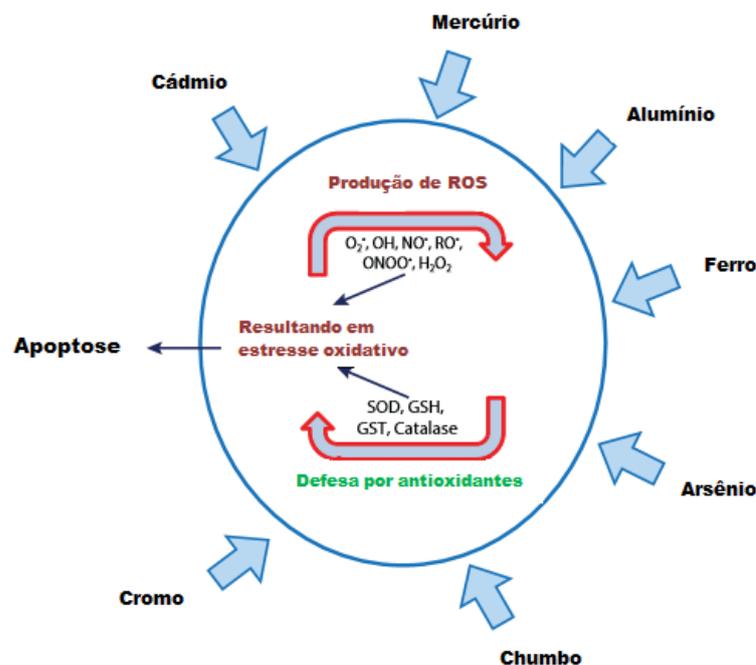


Figura 5 - Célula exposta a metais e sua consequente apoptose resultante do estresse oxidativo. Fonte: adaptado de Jaishankar et al. 2014, p.62.

A resolução nº 357 de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005) estabelece padrões de qualidade da água de classe 2. Dentre esses padrões, estão estabelecidos os valores máximos permitidos da concentração de metais (Cu, Pb, Zn, Ni, Mn, Fe, Cd, Cr, Al, Co) em água de classe 2, de modo a evitar efeito tóxico crônico a organismos expostos.

A concentração de metais acima dos limites permitidos na água dos rios pode causar a contaminação dos ecossistemas aquáticos e danos aos seres vivos (MARENGONI et al. 2013). Quando presentes na água, os metais podem ser absorvidos pelos organismos por meio de estruturas respiratórias e da superfície do corpo, se acumulando dessa forma em animais e plantas aquáticas (COSTA et al. 2008). A determinação dos metais e suas concentrações na água e no ambiente são de grande importância em estudos de monitoramento ambiental (SOUZA, 2010).

Além dos metais, a presença de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos vem sendo frequentemente estudada. De acordo com a EPA (United States Environmental Protection Agency), existe a preocupação dos efeitos dos contaminantes emergentes para a vida aquática, tendo em vista que tais contaminantes estão sendo cada vez mais encontrados em baixos níveis nas águas superficiais. E, incluem os agrotóxicos, produtos de higiene pessoal e farmacêuticos. A poluição dos recursos hídricos por contaminantes orgânicos pode ser decorrente de atividades humanas, como a utilização de fármacos, resíduos de processos industriais e atividades agrícolas (DEBLONDE, 2011).

Os contaminantes emergentes não são facilmente eliminados da água pelo processo de tratamento de águas residuais. Dessa forma, tais compostos acabam sendo liberados no ambiente aquático, gerando preocupação sobre os efeitos que podem vir a causar nos organismos expostos (BOLONG et al, 2009). Um contaminante comumente encontrado em amostras de água é a cafeína. A presença deste composto em corpos hídricos indica que a água está contaminada por esgoto doméstico (SODRÉ et al., 2010). Os contaminantes: clomazona, malation, tebutiuron, hexazinona, atrazina e imidacloprido utilizados em atividades agrícolas podem causar a contaminação de corpos hídricos e prejudicar os organismos expostos (TOFOLI et al. 2009; CARMO et al. 2013; SINGH et al. 2013; MARTINS et al. 2014; OLIVEIRA et al. 2016; ALAMOSBRASIL, 2017).

Vários estudos tem evidenciado a toxicidade dos contaminantes emergentes a organismos expostos em ambientes aquáticos (FRANCO-BERNARDES et al. 2014, MARTINS et al. 2014, SPADOTO et al. 2013). Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de avaliar a presença de contaminantes emergentes e metais na água utilizada em pisciculturas, bem como a avaliação da toxicidade ocasionada pelos mesmos a organismos expostos.

Na região da Grande Dourados são escassos estudos que avaliem a ecotoxicidade da água de pisciculturas. Estas não possuem rotina em procedimento de avaliação das condições da água tanto das áreas de captação quanto das áreas de descarte de seus efluentes em rios. Diante do exposto, torna-se relevante a realização de pesquisas que avaliem as condições da água bem como a utilização de bioensaios que demonstrem os danos genéticos causados aos seres vivos expostos à água das pisciculturas da região da Grande Dourados. Esses resultados podem ser associados a dados topográficos, físico-químicos, concentração de contaminantes orgânicos e inorgânicos, e, auxiliar na adoção de medidas protetivas dos corpos hídricos.

Referências

ABIMORAD, E.G; STRADA, W.L; SCHALCH, S.H.C; GARCIA, F; CASTELLANI, D; MANZATTO, M. R. Silagem de peixe em ração artesanal para tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.5, p.519-525, 2009.

ALAMOSBRASIL. **Agroquímicos**. Disponível em: <<http://alamosbrasil.com.br/produtos?prd=52>>. Acesso em: maio de 2017.

ALMEIDA, E.R; MENDES, S.H.A. Criação de peixe no Tocantins: A contribuição da piscicultura para o desenvolvimento local. **Revista São Luis Orione**, 5(2), n.9, p.20-33, 2015.

AL-SABTI, K; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, 343(2-3): p.121-135, 1995.

AMES, B.N. The detection of mutagens with enteric bacteria. In: HOLLANDER, A. ed. **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**, New York: Plenum, v. 1, p.267-287, 1971.

BATISTA, A. **A contribuição da piscicultura para as pequenas propriedades rurais em Dourados-MS**. 2013. 94 f. Dissertação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2013.

BERTOLOZZO, E.L; FREIRE-MAIA, D.V; LERCO, M.M.P; SADY, M; HENRY, M.A.C.A. Avaliação dos danos do DNA na mucosa esofágica e sangue periférico de portadores da doença do refluxo gastroesofágico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, 23(4), p. 217-221, 2010.

BOLLER, K; SCHMID, W. Chemical mutagenesis in mammals-Chinese hamster cells as an in vivo test system. Haematological finding after treatment with trenimon. **Human Genetics**, 11, p.34-54, 1970.

BOLOGNESI, C; PERRONE, E; ROGGIERI, P; PAMPANIN, D; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, 78, p.93-98, 2006.

BOLONG, N; ISMAIL, A.F; SALIM, M.R; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, 239, p.229-246, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução 357/2005**. Brasília: 2005. 23p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução 430/2011**. Brasília: 2011. 8p.

BRIANEZI, G.S; CAMARGO, J.L.V; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 45(4): p.325-334, 2009.

BUCKER, A; CARVALHO, W; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagenese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, 36 (3): 354-364, 2006.

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

CARMO, D. A; CARMO, A. P. B; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, n. 1, p. 133-143, 2013.

CASSIANO, C.C. **O papel dos remanescentes florestais na manutenção da qualidade da água em microbacias agrícolas**. 2013. 116 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 129 f. Dissertação. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

CHRISTOFOLETTI C.A; PEDRO-ESCHER, J; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay, **Water Air Soil Pollution**, p. 224-1523, 2013.

COELHO, V.H.R; MONTENEGRO, S.M.G.L; ALMEIDA, C.N; LIMA, E.R.V; NETO, A. R; MOURA, G.S.S. Dinâmica do uso e ocupação do solo em uma bacia hidrográfica do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.1, p. 64-72, 2014.

COLLINS, A.R; OSCOZ, A.A; BRUNBORG, G; GAIVAO, I; GIOVANNELLI, L; KRUSZEWSKI, M. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, 23(3): p. 143-51, 2008.

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

COSTA, R.M.A; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, p. 24-26, 2012.

DEBLONDE, T; COSSU-LEGUILE, C; HARTIMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 214 p. 442-448, 2011.

DI PAOLO, C. **Aplicação do ensaio Cometa a estudos de dano ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos a B-naftoflavona**. 2006. 103 f. Dissertação. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DOTTI, A; Valejo, P.A.P; Russo, M.R. Licenciamento ambiental na piscicultura com enfoque na pequena propriedade: uma ferramenta de gestão ambiental. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, 3(1): p. 6-16, 2012.

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

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesca e Piscicultura no Pantanal**, 191p, 2010.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Pesquisas em aquicultura podem mudar cenários produtivos em Mato Grosso do Sul**, 2012. Disponível em:<

<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1464102/pesquisas-em-aquicultura-podem-mudar-cenarios-produtivos-em-ms>> Acesso em: junho de 2017.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Qualidade da Água/Piscicultura Familiar**, 8p, 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Noções para piscicultura familiar: qualidade da água, 2016. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/145045/1/qualiaguaonline.pdf>> Acesso em: junho de 2017.

EPA. **United States Environmental Protection Agency**. Disponível através do link <<http://www.epa.gov/esd/bios/pdf/contaminants-biosolids2.pdf>> Acesso em: junho de 2017.

FAIRBAIRN, D.W; OLIVE, P.L; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, 339: p. 37–59. 1995.

FARIAS, J.F; SILVA, E.V; RODRIGUEZ, J.M.M. Aspectos do Uso e Ocupação do Solo no Semiárido Cearense: Análise Espaço Temporal (1985 - 2011) Sob o Viés da Geoecologia das Paisagens. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.06, n.02, p. 136-147, 2013.

FERREIRA, A.P; HORTA, M.A.P; CUNHA, C.L.N. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nyctiorax nyctiorax* (garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, 10(2): p. 229-241, 2010.

FIPERJ. **Piscicultura/Aquicultura**. Disponível em: <<http://www.fiperj.rj.gov.br/index.php/aquicultura/psicultura>>. Acesso em: junho de 2017.

FISKESJÖ, G., The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, 102: p. 99–112, 1985.

FISKESJÖ, G., The Allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality: Na International Journal**, 8, p. 291-298, 1993.

FRANÇA, D.D. **Avaliação da atividade mutagênica de águas superficiais utilizadas para abastecimento público após tratamento na bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá.** 2006. 109 f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmaceuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FRANCO-BERNARDES, M.F; MASCHIO, L.R; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V; ALMEIDA, E.A. Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 59-67, 2014.

GALVAN, G.L. **Avaliação genotóxica de efluentes químicos de laboratórios de instituição de ensino e pesquisa utilizando como bioindicador o peixe *Astyanax altiparanae* (Characidae).** 2011. 102 f. Dissertação. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GOMES, J.V; TEIXEIRA, J.T.S; LIMA, V.M; BORBA, H.R. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p. 48-58, 2015.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental Mutagens. **Mutation Research**, 310, p. 175–185, 1994.

HISANO, H. **A piscicultura na região da Grande Dourados.** Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=23474&secao=Artigos%20Especiais>>. Acesso em: junho de 2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013) **Produção da Pecuária Municipal**, v.41, 108p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015) **Produção da Pecuária Municipal**, v.43, 47p.

JAISHANKAR, M; TSETEN, T; ANBALAGAN, N; MATHEW, B.B; BEEREGOWDA, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**.7(2): p. 60–72, 2014.

KAUANO, E.E; PASSOS, E. Análise do uso da terra em áreas de preservação permanente da bacia hidrográfica do Rio da Gama, Tijucas do Sul, Paraná. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, 6(2), p. 181-190, 2008.

KUMMROW, F; MARTINS, R.S.L; LELIS, C.M; RECH, C.M; MATTA, M.E.M; UMBUZEIRO, G.A. Caracterização da mutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos de lodos tratados de cinco estações de tratamento de esgoto (ETE) localizadas no Estado de São Paulo. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, vol.3, nº 3, 2010.

LEBAILLY, P; DEVAUX, A; POTTIER, D; MEO, M; ANDRE, V; BALDI, I; SEVERIN, F; BERNAUD, J; DURAND, B; HENRY-AMAR, M; GAUDUCHON P. Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. **Occupational and Environmental Medicine**, 60: p. 910-917, 2003.

LEIRA, M.H; CUNHA, L.T; BRAZ, M.S; MELO, C.C.V; BOTELHO, H.A; REGHIM L.S. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **Pubvet**, 11(1), p. 11-17, 2017.

LEME, D.M; MARIN-MORALES, M.A. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, 682: p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, 24: 471–486, 1938.

MARENGONI, N.G; KLOSOWSKI, E.S; OLIVEIRA, K.P; CHAMBO, A.P.S; GONÇALVES JUNIOR, A.C. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. **Química Nova**, 36(3), p. 359-363, 2013.

MARTINS, A.S; FERREIRA, T.C.R; CARNEIRO, R.L; LANZA, MR.V. Simultaneous degradation of hexazinone and diuron herbicides by H₂O₂/UV and toxicity assessment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25(11), p. 2000-2006, 2014.

MASCHIO, L.R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP**. 2009. 208 f. Tese. Instituto de Biociências, Letras e Ciências. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

MATO GROSSO DO SUL. **Lei nº 1653, de 10 de janeiro de 1996**. Define e disciplina a piscicultura no estado de Mato Grosso do Sul e dá outras providências. Campo Grande: 1996.

MATSUMOTO, S.T; MANTOVANI, M.S; MALAGUTTI, M.I.A; DIAS, A.L; FONSECA, I.C; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006 .

MAXIMIANO, A.A; FERNANDES, R.O; NUNES, F.P; ASSIS, M.P; MATOS, R.V; BABOSA, C.G.S; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, 10(2): p. 483-491, 2005.

MORAIS, M.S; GONTIJO, B.M; PIUZANA, D. Análise temporal do uso e ocupação do terreno do Parque Estadual do Biribiri e de sua Zona de Amortecimento, município de Diamantina, Minas Gerais. **Caderno de Geografia**, v.26, n.46, p. 362-381, 2016.

MORTELMANS, K; ZEIGER, E.. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, 455: p. 29-60, 2000.

NUNES, J.F; ROIG, H.L. Análise e mapeamento do uso e ocupação do solo da Bacia do Alto do Descoberto, DF/GO, por meio de classificação automática baseada em regras e lógica nebulosa. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 25-36, 2015.

OLIVERIA, C.R; FRACETO, L.F; RIZZI, G.M; SALLA, R.F; ABDALA, F.C; COSTA, M.J; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, 149, p. 304-313, 2016.

OLIVEIRA, G.B. **Avaliação da genotoxicidade das águas do lençol freático sob a Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. 2007. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PALHARES, D; GRISOLIA, C.K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocyte in *Tilapia* fish, following mitomycin C treatment. **Genetics And Molecular Biology**, 25: p. 281-284, 2002.

PINTO, A.G.N; HORBE, A.M.C; SILVA, M.S.R; MIRANDA, S.A.F; PASCOALOTO, D; SANTOS, H.M.C. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus/AM. **Acta Amazonica**, 39(3), p. 627-638, 2009.

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

REBOUÇAS, P.M; LIMA, L.R; DIAS, I.F; FILHO, J.A.D.B. Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, 2(2), p. 25-44, 2014.

SANTOS, C.L; VITAL, S.R.O. Formation of processes erosion associated with the use and occupation of soil in the Ribeira river basin, city of Santa Rita / PB. **Revista Geama**, v.6, n.1, p. 53-66, 2016.

SANTOS, D.B; SCHIAR, V.P.P; PAIXÃO, M.W; NOGUEIRA, C.W; ASCHNER, M; ROCHA, S.G; VASQUEZ, M; HARTMANN, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**, v. 681, p. 3–12, 2009.

SATOLANI, M.F; CORRÊA, C.C; FAGUNDES, M.B.B. Análise do ambiente institucional e organizacional da piscicultura no estado de Mato Grosso do Sul. **Revista de Economia e Agronegócio**, 6(2): p. 215-234, 2008.

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

SCHOTTENFELD, D; BEEBE-DIMMER, J. Chronic inflammation a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *A Cancer Journal for Clinicians*, 56: p. 69-83, 2006.

SILVA, G.S; JARDIM, W.F. Um novo índice de qualidade das águas para proteção da vida aquática aplicado ao Rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia-SP. **Química Nova**, 29(4), p. 689-694, 2006.

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

SILVA, R.R.P; PIRES, O.R; GRISOLIA, C.K. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. **Toxicon**, 58: p. 259-264, 2011.

SINGH, B; KAUR, J; SINGH, K. Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. **Critical Reviews Microbiology**, early online, p. 1-9, 2013.

SINGH, N; MCCOY, M; TICE, R; SCHNEIDER, L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, n. 175, p. 184-199, 1988.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL (SBMCTA). **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio de *Salmonella/microsoma*)**, 2004. Disponível em: <http://mutagen-brasil.org.br/documentos.pdf>. Acesso em junho de 2017.

SODRÉ, F.F; LOCATELLI, M.A.F; JARDIM, W.F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water Air and Soil Pollution**, v. 206, p. 57-67, 2010.

SOUZA, C.C. **Aplicação dos ensaios *Salmonella/microsoma* e MTT para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e fotocátalise**. 2014. 113 f. Dissertação. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

SOUZA, C.M.A. Plano Estratégico de Desenvolvimento da Cadeia do Pescado no Território da Grande Dourados, PROCAPTAR/UFGD. Campo Grande – MS, 2012.

SOUZA, T.S; FONTANELLI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alteration of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affect by refinery effluents. **Mutation Research**, v. 605: p. 87-93, 2006.

SOUZA, V.M. **Bioindicadores animais de metais poluentes**. 2010. 68 f. Dissertação. Instituto de Ecologia. Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.

SPADOTO, M. (2013). **Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce**. 2013. 118 f. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SÚAREZ, Y.R; SILVA, E.A; VIANA, L.F. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. **Environmental Biology of Fishes** online, 2017.

TAGLIARI, K.C; CECCHINI, R; SARIDAKIS, H.O. Teste de AMES como uma ferramenta para detecção de citotoxicidade e mutagenicidade causadas por metais pesados e radicais livres. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, 18(2): p. 41-50, 1999.

TEIXEIRA, P. **Núcleo Estadual de apoio aos APLs**. Arranjo produtivo da piscicultura da região de Dourados – MS, 32p, 2007.

TOFOLI, G.R; VELINI, E.D; NEGRISOLI, E; CAVENAGHI, A.L; MARTINS, D. Dinâmica do tebutiuron em palha de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, 27(4), 815-821, 2009.

UMBUZEIRO, G.A; ROUBICEK, D.A; SANCHEZ, P.S; SATO, M.I.Z. The Salmonella mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. **Mutation Research**, 491: p. 119-126, 2001.

UMBUZEIRO, G.A; ROUBICEK, D.A; RECH, C.M; SATO, M.I.Z; CLAXTON, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, 54, p. 1589-1597, 2004.

UMBUZEIRO, G.A; RECH, C.M; CORREIA, S; BERGAMASCO, A. M; CARDENETTE, G. H. L; FLUCKIGER-ISLER, S; KAMBER, M. Comparison of the Salmonella / Microsome Microsuspension Assay with the new Microplate Fluctuation Protocol for Testing the Mutagenicity of Environmental Samples. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 38, p. 31–38, 2010.

VENDRAMINI, J.M.B; SILVEIRA, M.L.A; DUBEUX JR, J.C.B; SOLLENBERGER, L.E. Environmental impacts and nutrient recycling on pastures grazed by cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36, p. 139-149, 2007.

VIANA, L.F. **Peixes como bioindicadores: influência da integridade ambiental na biologia alimentar e reprodutiva de *Astyanax altiparanae* na bacia do Rio Ivinhema, alto Rio Paraná**. 2013. 48 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Dourados, MS. 2013.

VIANA, L.F; NEIVA, D.M; SOUZA, B.O; SÚAREZ, Y.R; CRISPIM, B.A; GRISOLIA, A.B; LIMA-JUNIOR, S.E. Existe influência do sexo e da massa sobre os efeitos mutagênicos em *Astyanax lacustris* submetidos à diferentes níveis de integridade ambiental? **Anais...Dourados**: 1º Simpósio Científico sobre Recursos Naturais – SCRN, 2017.

VIANA, L.F; TONDATO, K.K; SÚAREZ, Y.R; LIMA-JUNIOR, S.E. Influence of environmental integrity on the reproductive biology of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 in the Ivinhema river basin. **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 2, p. 165-173, 2014.

WAMBACH, X.F. **Manejo prático aplicado a piscicultura de água doce**. 2012, 28 f. Programa de Educação Tutorial (PET/MEC/SESu). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE. 2012.

CAPÍTULO II

Integração topográfica, química e biológica para avaliação da qualidade da água de Pisciculturas

¹Jéssica Pereira de Souza, ¹Juliana Caroline Vivian Spósito, ¹Bruno do Amaral Crispim, ¹Fabiane Gomes da Silva, ²Kelly Mari Pires de Oliveira, ³Fábio Kummrow, ⁴Valter Aragão do Nascimento, ⁵Cassiana Carolina Montagner Raimundo & ²Alexéia Barufatti Grisolia*

¹Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

³Departamento de Ciências Exatas e da Terra - Setor de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil.

⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁵Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

*Correspondência do autor: Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso. Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brasil. Tel.: +55 67 34102223. E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br (Grisolia, AB).

Resumo

A região da Grande Dourados apresenta potencial para a piscicultura, devido à disponibilidade de água, clima e terras apropriadas à atividade. No entanto, substâncias utilizadas para o manejo dessa prática podem ocasionar mudanças nas condições da água. As pisciculturas existentes nesta região captam água de córregos ou nascentes, e descartam seus efluentes sem tratamento em rios da região. São escassos estudos que avaliem o impacto causado pela aquicultura e as possíveis consequências decorrentes dessa atividade aos rios que recebem seus efluentes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade da água de duas pisciculturas da região da Grande Dourados, desde a captação até o descarte, em períodos de inverno e verão, por meio da utilização de parâmetros topográficos, físicos, químicos e biológicos. Para tanto, foram realizadas a elaboração de mapa de uso e ocupação do solo/mapa topográfico, e coletas de água em quatro pontos assim denominados: captação, tanque 1, tanque 2 e tanque de descarte. Foram realizados teste de *Allium cepa*, ensaios com *Astyanax lacustris* e teste de *Salmonella*/microsoma. E, monitorados parâmetros físico-químicos, condições ambientais, determinação de metais e contaminantes emergentes na água. Os resultados demonstraram que o período do inverno apresentou maiores alterações genéticas em relação ao verão, o que pode ser atribuído à baixa pluviosidade deste período. Os resultados provenientes dos ensaios com *A. lacustris* e o Teste de *Salmonella*/microsoma demonstraram genotoxicidade e mutagenicidade nas amostras de água das pisciculturas, e permitiram observar maiores alterações genéticas nos tanques de descarte de água das duas pisciculturas. As alterações genéticas observadas podem estar relacionadas à presença de metais e contaminantes emergentes nas amostras de água. Considerando que águas contaminadas possuem potencial de perturbar a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas naturais, a pesquisa revelou a importância

do tratamento dos efluentes, de forma a minimizar os impactos negativos decorrentes dessa atividade nas bacias dos rios Dourados e Brilhante.

Palavras chave: *Allium cepa*, *Astyanax lacustris*, contaminantes emergentes, efluentes de piscicultura.

1 Introdução

A conservação da boa qualidade da água baseado em seus parâmetros físicos, químicos e biológicos é indispensável para o desenvolvimento da atividade de piscicultura (Boyd e Tucker 2014). As águas destinadas à aquicultura e atividades de pesca, classe 2, devem seguir regulamentação que indique condições físico-químicas e microbiológicas ideais para corpos de água onde ocorre a atividade de pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo intensivo. Para determinação dessas condições ideais, ensaios ecotoxicológicos padronizados ou outros métodos reconhecidos cientificamente devem indicar ausência de efeito tóxico crônico em organismos (CONAMA 2005).

A região da Grande Dourados conta com 1200 hectares de lâmina d'água destinados para a atividade de piscicultura, possuindo aproximadamente 288 pisciculturas atuantes na região, e sendo responsável por 27,5% da produção de peixe do estado de Mato Grosso do Sul, se tornando importante polo para o desenvolvimento desta prática (EMBRAPA 2012; Souza 2012). Esta região apresenta condições climáticas adequadas como ampla disponibilidade de água, clima e solo em condições favoráveis para a criação de peixes (Batista, 2013). Dentre os recursos hídricos existentes como fonte de água para abastecimento de tanques de pisciculturas da região da Grande Dourados, 83,4% é proveniente de nascentes e 16,6% proveniente de córregos (Dotti et al. 2012).

Substâncias oriundas da produção e despejo de resíduos no ambiente natural vêm crescendo progressivamente, tanto em áreas rurais quanto industriais, podendo causar danos no material genético de organismos vivos, prejudicando e alterando seus processos vitais (Costa e Menk 2012). Contudo, o uso de substâncias para o manejo da prática piscícola pode ocasionar em mudanças nas condições da água, que muitas vezes é liberada aos rios sem tratamento. Teixeira (2007) observou que menos de 10% das pisciculturas possuem tanque de decantação de seus efluentes, sendo que os 90% restantes retornam seus efluentes para os rios sem tratamento.

Outro aspecto relevante para avaliação dos corpos hídricos refere-se à presença de metais. Os metais em pequenas concentrações fazem parte de processos fisiológicos sendo denominados de elementos essenciais, não apresentando riscos aos ecossistemas. Entretanto alguns metais, em altas concentrações são caracterizados como poluentes com ação mutagênica, genotóxica e citotóxica (Christofolletti et al. 2013).

Além dos metais, os contaminantes emergentes têm sido amplamente detectados em recursos hídricos e considerados susceptíveis a ocasionar efeitos negativos no meio aquático (Maraschin 2003). Os contaminantes provêm de diferentes origens e natureza química como fontes urbanas e rurais, incluindo nanomateriais, agrotóxicos, produtos farmacêuticos, compostos industriais, produtos de higiene pessoal, subprodutos de tratamento de água, cafeína, nicotina entre outros. Segundo Silva e Nogueira (2008) contaminantes emergentes utilizados em produtos de higiene pessoal como o triclosano corresponde a um composto químico que pode ser prejudicial aos organismos aquáticos.

Nesse contexto, a avaliação do uso e ocupação do solo é fundamental na identificação das possíveis fontes de contaminação dos recursos hídricos por metais e contaminantes orgânicos. A utilização do solo de maneira inadequada pode ocasionar em problemas ambientais e comprometimento dos recursos hídricos (Farias et al. 2013; Santos e Vital 2016).

Em estudos de monitoramento ambiental, para avaliação toxicidade que pode ser causada por metais e contaminantes orgânicos aos recursos hídricos, diferentes bioensaios podem ser utilizados, dentre eles, destacam-se os bioensaios vegetais utilizando *Allium cepa*, os bioensaios animais utilizando *Astyanax lacustris* e o teste de *Salmonella/microsoma*. A eficiência do Teste de *Allium cepa* tem sido comprovada no monitoramento de amostras ambientais (Leme e Marin-Morales 2009). O Teste de micronúcleo píceo e alterações morfológicas nucleares tem apresentado eficácia na detecção de mutagenicidade e genotoxicidade, respectivamente, em ambientes aquáticos (Ramsdorf et al. 2009; Souza e Fontanelli 2006). A eficácia do ensaio do cometa tem sido comprovada na avaliação de genotoxicidade em ambientes aquáticos (Bucker et al. 2006). O teste de *Salmonella/microsoma* tem sido utilizado com eficácia na avaliação da mutagenicidade de amostras de água (Souza 2014).

Considerando o número reduzido de trabalhos que avaliem o impacto causado pela aquicultura e os efeitos de seus efluentes que serão lançados aos corpos hídricos, torna-se necessária a realização de pesquisas que avaliem o uso e ocupação do solo e a toxicidade dos contaminantes químicos em água de pisciculturas. Diante do exposto, o presente estudo objetivou verificar a qualidade da água de dois sistemas produtivos de pisciculturas localizados na região da Grande Dourados desde sua captação até o descarte em períodos de inverno e verão, utilizando parâmetros topográficos, físicos, químicos e biológicos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Área de estudo

A área de estudo foi denominada de acordo com o descarte de água dos tanques como Piscicultura Rio Dourados (PRD) e Piscicultura Rio Brilhante (PRB) existentes na região da Grande Dourados. Em cada piscicultura a água foi coletada em quatro pontos: tanque de captação, tanque de armazenamento 1, tanque de armazenamento 2 e tanque de descarte.

Na PRD, a água foi coletada dos seguintes pontos: tanque de captação (CAD, 22° 16' 41.2608" Sul e 55° 3' 39.42" Oeste), tanque 1 (T1D, 22° 16' 58.872" Sul e 55° 3' 18.396" Oeste), tanque 2 (T2D, 22° 17' 17.8116" Sul e 55° 3' 21.2148" Oeste) e tanque de descarte (TDD, 22° 17' 27.222" Sul e 55° 3' 18.2988" Oeste). Esta piscicultura recebe água de córrego localizado na própria propriedade e a água é descartada no Rio Dourados. Nas proximidades desta piscicultura são predominantes áreas de fragmentos florestais e agricultura (cultivo de cana-de-açúcar).

Na PRB, a água foi coletada dos seguintes pontos: Ponto de captação (CAB, 22° 6' 35.8236" Sul e 54° 34' 53.0616" Oeste), tanque 1 (T1B, 22° 6' 38.6028" Sul e 54° 34' 36.6816" Oeste), tanque 2 (T2B, 22° 6' 51.4152" Sul e 54° 34' 41.016" Oeste) e tanque de descarte (TDB, 22° 6' 46.188" Sul e 54° 34' 33.816" Oeste). Esta piscicultura recebe água de nascente localizada na propriedade e a água é descartada no rio Brilhante. Nas proximidades desta piscicultura foram identificadas áreas predominantes de agricultura (soja, milho, cana-de-açúcar) e pastagem (criação de animais).

2.2 Análise do uso e ocupação do solo

O mapeamento do uso e cobertura do solo das Pisciculturas foi feito a partir de imagens aéreas de alta resolução (anos 2015 e 2016) obtidas do Google Earth Pro®, com tamanho de pixel (célula) de 1 m. Para limite de estudo foram gerados buffers de 1.5 km de raio no entorno de cada ponto amostral (2 pontos) e as formas de uso do solo foram classificadas como agricultura, piscicultura, fragmentos florestais, plantações florestais, solo expostos, corpos de água, áreas úmidas, edificações e pastagem. Para interpretação das imagens foi utilizada uma classificação visual utilizando as ferramentas de digitalização proporcionadas pelo programa ArcGIS® 10.4 na sua versão teste (ESRI 2015), calculando-se as áreas e as porcentagens de cada categoria de ocupação do solo.

2.3 Avaliação das condições climáticas e coleta de água para as análises biológicas e mensuração de dados físico-químicos

A coleta de água para as análises biológicas, mensuração dos parâmetros físico-químicos e condições climáticas foi realizada em período de inverno (junho de 2015) e verão (novembro de 2015). As condições climáticas foram mensuradas de acordo com o site Guia Clima da Embrapa, sendo que calculou-se a média das condições climáticas (temperatura do ar, pluviosidade e umidade relativa) quinze dias antes das coletas.

As amostras de água destinadas aos bioensaios animais foram coletadas em galões de polietileno de 20 litros. As amostras designadas ao bioteste vegetal e ao teste de *Salmonella*/microssoma foram coletadas em frascos de vidro de 1000 mL em cada ponto amostral.

As condições físico-químicas da água em todos os pontos amostrais foram mensuradas. Os parâmetros referentes à temperatura da água (°C), potencial de hidrogênio (mV), oxigênio dissolvido (mg/L) e condutividade elétrica (mS/cm), foram mensurados por sonda multiparâmetro YSI Professional Plus.

2.4 Bioteste Vegetal

Teste de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade em *Allium cepa*

O protocolo utilizado foi adaptado de Matsumoto e Marin-Morales (2005) com modificações. Foram utilizados como controles trifuralina a 0,19% (controle positivo) e água destilada (controle negativo). Preparou-se uma placa com 50 sementes para cada ponto amostral. Sementes foram expostas ao tratamento por 96 horas, coletadas com 1,5cm de comprimento das raízes e posteriormente os meristemas apicais foram fixados em Solução Carnoy 3:1 (álcool / ácido acético). 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 e carmim acético a 2%. Para cada tratamento preparou-se 10 lâminas, sendo contadas 500 células por lâmina, totalizando 5000 células por ponto. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon, no aumento de 400x. Para análise dos efeitos citotóxicos foram avaliados o índice mitótico (IM) e índice de morte celular (IMC), para avaliar o efeito genotóxico foi utilizado o índice de alterações cromossômicas (IAC), e para avaliar a mutagenicidade utilizou-se o índice de mutagenicidade (IMT).

Os índices foram calculados utilizando as seguintes fórmulas:

$$IM = \frac{\text{Total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$
$$IMC = \frac{\text{Total de células em morte}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$
$$IMT = \frac{\text{Total de células com micronúcleo}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$
$$IAC = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

2. 5 Ensaios com *Astyanax lacustris*

Indivíduos jovens de *Astyanax lacustris*, obtidos em comércio local e com aproximadamente mesmo tamanho (aproximadamente 10 cm), foram mantidos em aquários de vidro, contendo vinte litros de água oriundas dos pontos amostrais sob constante aeração, fotoperíodo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de 23°C (± 2°C) no Laboratório de mutagênese ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), por período de exposição de 72 horas. Para o grupo controle negativo, foi utilizada água mineral comercial. O experimento foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em pesquisa animal (Parecer nº 10/2015) da UFGD (Anexo II).

2. 5. 1 Teste de Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares em *Astyanax lacustris*

O teste de micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares seguiu o protocolo descrito por Schmid (1975) e Heddle (1983) com adaptações.

Após o período de exposição, cinco peixes (*Astyanax lacustris*) de cada ponto amostral foram anestesiados em gelo. Em seguida, com auxílio de tesoura cirúrgica foi realizado corte na nadadeira caudal para coleta de sangue (0,1 mL) destinado ao esfregaço dos eritrócitos para contagem de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. Duas extensões sanguíneas de cada peixe foram realizadas e colocadas para secar a temperatura ambiente.

Lâminas foram coradas com Reativo de Schiff e contra-coradas com Fast green. A contagem dos micronúcleos e alterações morfológicas nucleares foi realizada em microscópio óptico Nikon, no aumento de 1000X. De cada peixe foram contadas 2.000 células e calculado a frequência de micronúcleos (MCN) e índice de genotoxicidade (IG).

Para calcular a frequência de micronúcleos (MCN) e o índice de genotoxicidade (IG) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$MCN = \frac{\text{Total de micronúcleos}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$
$$IG = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

2. 5. 2 Ensaio do cometa em *Astyanax lacustris*

O ensaio do cometa em *Astyanax lacustris* seguiu metodologia proposta por Ventura (2004) com adaptações. Os mesmos peixes utilizados para o teste de micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares foram utilizados para o ensaio do cometa, totalizando cinco peixes por ponto amostral.

O sangue foi coletado por punção branquial (6µL) e diluído em 2000µL de solução salina (PBS). Duas lâminas foram confeccionadas para cada um dos peixes e cada lâmina foi preparada com 20µL 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 e em seguida 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, posteriormente coradas com brometo de etídeo (0,002mg/mL) e 50 nucleóides por lâmina foram classificados e contados visualmente por um único observador em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x.

A classificação dos danos de acordo com o tamanho da cauda do nucleóide seguiu os critérios de Ventura (2004). Foram realizados os cálculos de células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS) e células com cometa (TCA):

$$CS = (dano1X1) + (dano2X2) + (dano3X3) + (dano4X4) \quad TCA = dano1 + dano2 + dano3 + dano4$$

2. 6 Teste de *Salmonella*/microssoma

O potencial mutagênico das amostras de água das pisciculturas foi avaliado pelo método de microsuspensão com adaptações, proposto por Kado et al (1983). Considerando limitações do laboratório, o teste de *Salmonella*/microssoma foi realizado no período do inverno por este representar a situação mais crítica com base nas outras análises biológicas.

As amostras de água foram filtradas em membranas de nitrocelulose 0,45 µm, imediatamente após a chegada ao laboratório. Posteriormente, a extração orgânica e concentração das amostras foram realizadas pelo processo de extração em fase sólida (SPE) com cartuchos de polipropileno (6 mL) Oasis HLB 6cc 200 mg (Waters Milford, MA, USA). As amostras de água foram carregadas nos cartuchos com um fluxo de aproximadamente 10 mL/min. A eluição dos cartuchos foi realizada com 3 mL de acetato de etila e 3 mL de metanol. Os extratos obtidos foram rotaevaporados e resuspendidos em DMSO nas concentrações desejadas.

Os ensaios foram realizados com linhagens de *Salmonella* Typhimurium TA98 (hisD3052/rfa/urvB/pKM101/Ap^R) e TA 100 (hisG46/rfa/ΔuvrB/pKM101/Ap^R) na presença e ausência de ativação metabólica (fração S9, Moltax Molecular Toxicology Inc., EUA.). Para o preparo do inóculo, a suspensão bacteriana foi inoculada em 20 mL Caldo Nutriente n°2 (Oxoid, Inglaterra) a 37°C *overnight* em uma incubadora com agitação orbital. A fim de se obter uma suspensão de aproximadamente 1-2x10⁹ bactérias/mL, o inóculo foi padronizado em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 650 nm e absorvância de 0,4. O inóculo padronizado foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos, a 4°C e posteriormente, ressuspendido em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mM.

No ensaio sem ativação metabólica foram adicionados em cada tubo 0,005 mL da dose 50 mL/eq, 0,05 mL da suspensão bacteriana e 0,05 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mM. No ensaio com ativação metabólica foram adicionados 0,05 mL da fração S9 em substituição ao tampão fosfato de sódio. Os tubos foram incubados por 90 minutos a 37°C. Após o período de pré-incubação, 2 mL de “top ágar” (0,6% (w/v) cloreto de sódio, 0,6% (w/v) ágar-ágar, 0,5 mM L-Histidina, 0,5% (w/v) D-Biotina) foram adicionados a solução e os tubos foram homogeneizados e vertidos em placas com Ágar Mínimo Glicosado (AMG) (1,5% (w/v) ágar-ágar, solução de glicose 10% (v/v) e 0,02% (v/v) solução de Vogel Boner 50x). O número de colônias revertentes por placa, *his+*, foi mensurado após 48-66 horas a 37°C de incubação. Os ensaios foram realizados em dose única (50 mL/equivalente).

Nos ensaios sem ativação metabólica foram utilizados os seguintes controles positivos: 4-nitro-ofenilenodiamina (NPD, 10µg/placa) para linhagem TA98 e azida sódica (2,5µg/placa) para a linhagem TA100. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o composto 2-aminoantraceno (2-AA 0,625 µg/placa) para as linhagens TA 98 e TA 100. Os controles negativos foram realizados com o solvente da amostra, DMSO (5 µL/placa).

Os valores de reversão em colônias por placa para controles positivo encontrados foram 271,5 para linhagem TA98 sem ativação metabólica, 902,5 para linhagem TA98 com ativação metabólica, 909,0 para linhagem TA100 sem ativação metabólica e 902,5 para linhagem TA100 com ativação metabólica.

Os valores de reversão em colônias por placa para controles negativo encontrados foram 52,8 para linhagem TA98 sem ativação metabólica, 52,0 para linhagem TA98 com ativação metabólica, 177,0 para linhagem TA100 sem ativação metabólica e 151,24 para linhagem TA100 com ativação metabólica.

A razão de mutagenicidade (RM) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$RM = \frac{\text{Número de revertentes/amostra}}{\text{Controle negativo}}$$

A amostra foi considerada com potencial mutagênico quando a razão de mutagenicidade (RM) foi igual ou maior que 2,0. Os resultados do teste foram apresentados de forma qualitativa. Os resultados de RM maior que 2,0 foram considerados positivos. Os resultados de RM menor que dois foram considerados negativos. Os resultados de RM menor que 7,0 foram considerados tóxicos.

2. 7 Coleta de água e Análises Químicas

Considerando os resultados obtidos por meio das análises biológicas e demais parâmetros, posteriormente foi realizada coleta de água nos mesmos pontos amostrais em junho de 2016 para a realização de análise de metais e contaminantes emergentes na água.

2. 7. 1 Amostragem e determinação de metais em água.

As amostras de água foram coletadas utilizando-se frascos de vidro de 1000 mL. No local da coleta foi adicionado ácido nítrico (grau analítico) à amostra até atingir pH inferior a 2. Os frascos foram vedados, transportados até o Laboratório de Metabolismo Mineral e Biomateriais da Faculdade de Medicina da UFMS e armazenados em refrigeração até o momento da análise.

A concentração de elementos (Fe, Mn, Cr, Al, Cu, Zn, Ni, Cd, Co) foi determinada utilizando um espectrômetro de emissão óptica indutivamente acoplado com plasma de argônio (ICP-OES) da marca ThermoScientific, EUA, modelo iCAP 6000®.

A metodologia da determinação de metais em água foi adotada de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de Mermert e Poussuel (1995). A seletividade foi analisada a partir da largura e meia altura da base do sinal de emissão da linha de cada elemento conforme software "ITeva" disponível para o controle do equipamento.

O gás argônio utilizado foi de alta pureza (99,999%) e adquirido do fabricante White Martins. As concentrações dos diferentes elementos nas amostras foram determinadas utilizando as correspondentes curvas de calibração obtidas a partir de

soluções padrões dos elementos de interesse (Merck). Realizaram-se análises em triplicata para cada amostra, onde a reprodutividade foi avaliada a partir das flutuações do desvio padrão relativo (RSD) de três medidas consecutivas do sinal de emissão de cada elemento.

A validação do procedimento analítico ICP-OES para determinação quantitativa dos elementos com comprimentos de onda para valores selecionados e de linearidade é mostrada na Tabela 1. Durante a análise de ICP-OES, a intensidade da luz emitida por átomos livres em comprimentos de onda específicos medida é utilizada para determinar a concentração do elemento de interesse. Após a análise do último padrão, o R^2 (Linearidade) para a curva de calibração deve ser de 0,92 a 0,99 dependendo do elemento.

Tabela 1. Validação do método, série ICAP 6000-Duo, ThermoScientific, nebulização pneumática. Elementos com comprimentos de onda (nm) e Linearidade (R^2).

	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Comprimento de onda (nm)	308.215	214.438	228.616	283.563	327.396	239.562	257.610	341.476	213.856
Linearidade (R^2)	0,9763	0,9999	0,9999	0,9997	0,9962	0,8900	0,9999	0,9870	0,9960

2. 7. 2 Determinação de contaminantes emergentes

A determinação de contaminantes emergentes foi adaptado do método proposto por Montagner et al. (2014), Machado et al. (2016) e Acayaba (2015).

Amostras de água foram coletadas em frascos de vidro estéreis de 1000 mL. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química da Unicamp, Campinas-SP,.

Os compostos analisados foram: Cafeína, Imidacloprido, Carbendazim, 2-Hidroxi Atrazina, Carbofurano, Hexazinona, Tebutiuron, Atrazina, Diuron, Clomazona, Ametrina, Malation, Testosterona, Tebuconazole, Progesterona, Estriol, Bisfenol A, 17- α -etinilestradiol, Fipronil, Triclosan e Octilfenol, sendo que Soluções estoque individuais (400 mg L^{-1}) de cada composto foram preparados a partir do padrão sólido apropriado em metanol e armazenado em frascos de vidro âmbar a -4°C . Uma mistura contendo 10 mg L^{-1} de cada um dos compostos analisados foram preparados para diluição das soluções estoques e utilizado para preparar curvas analíticas.

As amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius, Alemanha) utilizando um suporte de sistema de filtração a vácuo, e, depois para determinação dos compostos em água foi utilizada a extração em fase sólida (SPE-solid phase extraction) com cartucho Oasis® HLB 500 mg de material de fase sorvente da Waters®. Na extração em fase sólida os cartuchos foram condicionados com duas alíquotas de 3,0 mL de metanol seguido de duas alíquotas de 3,0 mL de água ultrapura.

As amostras passaram em cartucho com vazão de $6,0 \text{ mL min}^{-1}$. Após a extração, os cartuchos foram envoltos com papel alumínio e armazenados sob refrigeração (4°C).

A lavagem dos cartuchos foi realizada utilizando 3 mL de água ultrapura. Depois, os analitos foram eluidos utilizando duas alíquotas de 2,5 mL de metanol seguido por uma alíquota de 2,0 mL de acetonitrila em um sistema de coletor de vácuo de 12 vias. A secagem dos eluatos foi realizada sob um fluxo suave de N_2 , e os extratos finais foram ressuspendidos em 0,4 mL de solução MeOH:H₂O 30:70 v:v, depois individualmente diluído quando necessário.

A análise química foi realizada por Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) utilizando um sistema Agilent 1200 Series LC acoplado a um Agilent 6410 Espectrômetro de massa triplo quadrupolo

equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), operado em modo de ionização (Tabela 2).

O monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi empregado para realizar a quantificação por espectrometria de massas. Durante as análises (LC-MS/MS) a linearidade (r^2) das curvas analíticas foi de 0,99.

Tabela 2: Parâmetros experimentais de LC-MS/MS selecionados para cada composto.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Modo ESI	Íons produto (m/z)			Energia de colisão (eV)				Abundância relativa (%)		Parâmetros instrumentais LDI (pg)	Coefficiente de correlação linear (r ²)
Caféina	3.091	195.1	(+)	138.1	110.1	69.1	15	20	20	31.7	12.0	15	0.988	
Imidacloprido	1.185	256.0	(+)	208.9 175.1			10	15		7.5		25	0.922	
Carbendazim	2.324	192.1	(+)	160.1	132.1	105.1	20	30	35	24.9	18.8	5	0.985	
2-Hidroxi Atrazina	3.091	198.2	(+)	156.2	114.1	86.1	15	20	20	40.3	66.4	5	0.991	
Carbofurano	4.491	222.0	(+)	165.0	123.0	55.0	10	20	16	22.0	15.3	5	0.988	
Hexazinona	5.071	253.2	(+)	171.1	85.1	71.1	8	30	31	80.4	53.2	5	0.992	
Tebutiuron	5.243	229.1	(+)	172.1	116.1	57.2	10	30	34	56.8	41.7	5	0.944	
Atrazina	5.877	216.2	(+)	174.1	103.9		15	15		17.4		5	0.851	
Diuron	6.245	233.0	(+)	72.1	72.1	46	20	20	16	35.6	99.4	5	0.855	
Clomazona	6.706	240.1	(+)		125.0			1		-		5	0.870	
Ametrina	6.877	228.2	(+)	186.1	158.1	138.1	15	20	20	14.9	22.9	5	0.928	
Malation	7.380	331.0	(+)	285.0	99.0		1	15		0.4		5	0.918	
Tebuconazole	9.098	308.2	(+)	124.9	70.0	70.0	30	10	20	2.1	15.0	5	0.991	
Testosterona	8.092	289.3	(+)	109.1	97.1	79.1	25	20	20	77.8	2.5	5	0.983	
Progesterona	10.335	315.3	(+)	109.1	97.2	79.2	15	25	30	63.0	7.7	5	0.992	
17- α -etinilestradiol	6.058	295.0	(-)	158.9	144.9	143.0	30	30	40	79.1	69.6	250	0.707	
Bisfenol A	5.562	227.0	(-)	210.9	132.9		30	25		82.8		50	0.953	
Estriol	4.448	287.0	(-)	170.9	144.9	143.0	30	35	40	91.6	53.9	75	0.994	
Fipronil	6.618	434.9	(-)	330.0	250.0	183.0	10	15	30	19.7	9.1	25	0.987	
Octilfenol	8.074	205.0	(-)		132.0	106.0		25	15	1.0		5	0.967	
Triclosan	6.849	287.0	(-)		35.1	37.1		5	5	37.8		75	0.994	

Limite de Detecção do Instrumento (LDI), fonte de ionização por electrospray (ESI), - ausência de dado.

2. 8 Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados provenientes dos testes com *Allium cepa* e *Astyanax lacustris* foram realizados usando a plataforma R (R Development Core Team 2014). Para comparação dos pontos de ambas pisciculturas, PRD e PRB, nos períodos de inverno e verão foi realizado o teste paramétrico ANOVA, com posteroi de Tukey ($\alpha=0.05$), tanto para *Allium cepa* (IM, IMC, IAC e IMT) quanto para *Astyanax lacustris* (IG, MCN, CS e TCA). Para as análises estatísticas de comparação entre os períodos de inverno e verão em cada ponto de coleta foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$) para o ensaio com *A. cepa* (IM, IMC, IAC e IMT) e para os ensaios com *A. lacustris* (IG, MCN, CS e TCA).

Para o teste de *Salmonella*/microsoma, os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, EUA, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, EUA), adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982).

3 Resultados

De acordo com a Fig. 1, baseando-se na classificação não supervisionada de uso e cobertura do solo feita com Sistema de Informação Geográfica (SIG), a piscicultura Rio Dourados apresentou ocupação predominante de fragmentos florestais (32,13%), agricultura (26,42%) e solo exposto (16,31%). Na piscicultura Rio Brilhante observou-se predominância de agricultura (48,02%), pastagem (38,95%) e fragmentos florestais (7,19%).

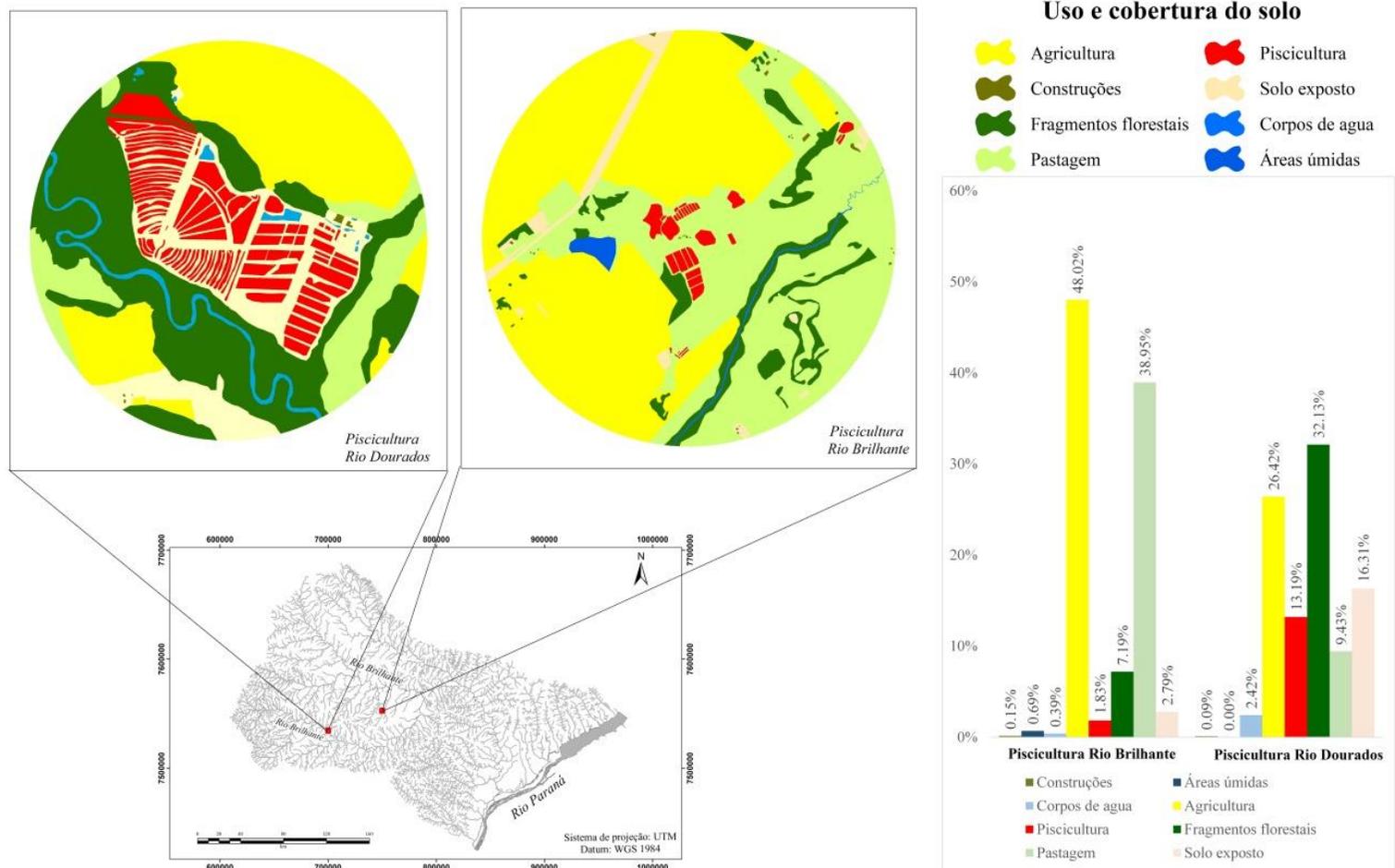


Fig. 1- Mapa de uso e ocupação do solo das pisciculturas Rio Dourados e Brilhante.

A Tabela 3 apresenta os resultados dos índices provenientes dos testes de *Allium cepa* e *Astyanax lacustris* nos pontos de captação ao descarte nas duas pisciculturas no período do inverno.

Tabela 3- Índice Mitótico (IM), Índice de morte celular (IMC), Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de mutagenicidade (IMT) em células meristemáticas de *Allium cepa*, e, número médio de Células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS), Células com cometa (TCA), Índice de genotoxicidade (IG), número médio de Micronúcleos (MCN) em *Astyanax lacustris* em cada ponto de coleta nas pisciculturas no inverno.

Teste <i>Allium cepa</i>					Teste <i>Astyanax lacustris</i>				
					Teste de micronúcleo		Ensaio do cometa		
Ponto	IM	IMC	IAC	IMT	IG	MCN	CS	TCA	
Piscicultura Rio Brilhante	¹ CAB	68,98±1,20 ab	0,00±1,00 a	0,80±1,65 b	0,02±1,00 b	0,32±3,65 a	0,03±1,00 a	106,80±1,15 b	35,20±1,13 b
	² T1B	63,11±1,08 ab	0,00±1,00 a	0,30±2,01 b	0,00±1,00 b	0,36±3,39 a	0,01±1,00 a	272,40±1,13 a	88,40±1,12 a
	³ T2B	56,86±1,19 bc	0,09±1,00 a	0,59±1,85 b	0,00±1,00 b	0,27±4,63 a	0,01±1,00 a	48,20±1,00 b	15,40±1,00 b
	⁴ TDB	72,88±1,06 a	0,08±1,00 a	0,74±2,20 b	0,04±1,00 b	0,07±2,00 a	0,00±1,00 a	305,80±1,10 a	96,60±1,03 a
	CN	44,68±1,42 c	0,09±1,00 a	0,51±2,93 b	0,00±1,00 b	0,75±2,02 a	0,05±1,63 a	11,20±1,40 b	6,60±1,44 b
	CP	2,57±1,21 d	1,39±5,29 a	35,86±1,85 a	4,17±1,38 a	-	-	-	-
Piscicultura Rio Dourados	⁵ CAD	62,32±1,23 a	0,02±1,00 a	0,83±1,80 b	0,00±1,00 b	1,40±2,90 a	0,02±1,00 a	260,00±1,70 a	82,80±1,27 a
	⁶ T1D	56,13±1,21 a	0,00±1,00 a	0,21±1,41 b	0,03±1,04 b	0,63±1,80 a	0,00±1,00 a	298,60±1,05 a	99,80±1,09 a
	⁷ T2D	60,62±1,15 a	0,00±1,00 a	0,17±1,45 b	0,02±1,00 b	1,00±1,67 a	0,00±1,00 a	276,80±1,19 a	82,00±1,14 a
	⁸ TDD	60,51±1,34 a	0,00±1,00 a	0,53±1,63 b	0,05±1,09 b	0,64±3,68 a	0,01±1,00 a	247,20±1,37 a	81,00±1,28 a
	CN	44,68±1,42 a	0,00±1,00 a	0,51±2,93 b	0,00±1,00 b	0,75±2,02 a	0,05±1,63 a	11,20±1,40 b	6,60±1,44 b
	CP	2,57±1,21 b	1,39±5,29 a	35,86±1,85 a	4,17±1,44 a	-	-	-	-

¹Valores seguidos de mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância. ¹Tanque de captação piscicultura Rio Brilhante (CAB), ² tanque 1 piscicultura Rio Brilhante (T1B), ³ tanque 2 piscicultura Rio Brilhante (T2B), ⁴tanque descarte piscicultura Rio Brilhante (TDB), ⁵Tanque de captação piscicultura Rio Dourados (CAD), ⁶tanque 1 piscicultura Rio Dourados (T1D), ⁷ tanque 2 piscicultura Rio Dourados (T2D), ⁸ tanque descarte piscicultura Rio Dourados (TDD), - ausência de dados para o período, Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP).

No inverno não houve diferença entre os pontos de captação ao descarte das duas pisciculturas nem se observou citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade quanto a IM, IMC, IAC, IMT, IG e MCN. Observando os resultados de CS e TCA percebeu-se na piscicultura rio Brilhante que na captação a água não apresentava genotoxicidade diferindo do tanque de descarte. Na piscicultura rio Dourados não houve diferença entre captação e descarte de água, porém os pontos de coleta apresentavam genotoxicidade quando comparados ao controle negativo.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos índices provenientes dos testes de *Allium cepa* e *Astyanax lacustris* nos pontos de captação ao descarte nas duas pisciculturas no período do verão.

Tabela 4- Índice Mitótico (IM), Índice de morte celular (IMC), Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de mutagenicidade (IMT) em células meristemáticas de *Allium cepa*, e, número médio de Células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS), Células com cometa (TCA), Índice de genotoxicidade (IG), número médio de Micronúcleos (MCN) em *Astyanax lacustris* em cada ponto de coleta nas pisciculturas no verão.

	Teste <i>Allium cepa</i>					Teste <i>Astyanax lacustris</i>			
	Ponto	IM	IMC	IAC	IMT	Teste de micronúcleo		Ensaio do Cometa	
						IG	MCN	CS	TCA
Piscicultura Rio Brilhante	¹ CAB	53,04±1,26 a	0,00±1,00 a	0,45±1,45 b	0,00±1,00 b	0,21±2,17 b	0,18±2,44 a	167,60±4,49 a	51,20±3,79 b
	² T1B	30,39±1,15 b	0,02±1,00 a	0,28±1,58 b	0,04±1,00 b	0,43±1,51 ab	0,14±2,26 a	248,40±1,46 a	75,80±1,38 ab
	³ T2B	46,50±1,43 ab	0,00±1,00 a	0,21±1,74 b	0,06±1,66 b	-	-	281,20±1,14 a	92,60±1,13 a
	⁴ TDB	47,83±1,25 ab	0,05±1,41 a	0,15±2,32b	0,02±1,00 b	0,94±1,32 a	0,08±3,96 a	292,00±1,14 a	92,80±1,08 a
	CN	44,68±1,42 ab	0,00±1,00 a	0,51±2,93 b	0,00±1,00 b	0,75±2,02 ab	0,06±1,63 a	11,20±1,40 b	6,60±1,44 c
	CP	2,57±1,21 c	1,39±5,29 a	35,86±1,85 a	4,17±1,44 a	-	-	-	-
Piscicultura Rio Dourados	⁵ CAD	32,05±1,17 b	0,02±1,00 a	0,30±2,78 b	0,05±1,63 b	-	-	-	-
	⁶ T1D	60,25±1,20 a	0,00±1,00 a	1,05±2,92 b	0,15±2,18 b	-	-	75,60±1,31 a	29,40±1,37 b
	⁷ T2D	54,11±1,22 a	0,00±1,00 a	0,70±3,29 b	0,07±1,00 b	0,56±1,51 a	0,04±1,54 a	100,20±3,12 a	38,00±1,84 b
	⁸ TDD	42,28±1,88 ab	0,07±1,00 a	0,97±2,64 b	0,00±1,00 b	-	-	84,20±1,64 a	48,60±1,46 a
	CN	44,68±1,42 ab	0,00±1,00 a	0,51±2,93 b	0,00±1,00 b	0,75±2,02 a	0,06±1,63 a	11,20±1,40 a	6,60±1,44 b
	CP	2,57±1,21 c	1,39±5,29 a	35,86±1,85 a	4,17±1,44 a	-	-	-	-

⁸Valores seguidos de mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância. ¹Tanque de captação piscicultura Rio Brilhante (CAB), ² tanque 1 piscicultura Rio Brilhante (T1B), ³ tanque 2 piscicultura Rio Brilhante (T2B), ⁴tanque descarte piscicultura Rio Brilhante (TDB), ⁵Tanque de captação piscicultura Rio Dourados (CAD), ⁶tanque 1 piscicultura Rio Dourados (T1D), ⁷ tanque 2 piscicultura Rio Dourados (T2D), ⁸ tanque descarte piscicultura Rio Dourados (TDD), - ausência de dados para o período, Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP).

No verão não se observou diferença entre os pontos de captação e descarte nem citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade quanto a IM, IMC, IAC, IMT e MCN nas duas pisciculturas. Na piscicultura rio Brilhante, com relação ao IG houve maior alteração genética no descarte quando comparado ao ponto de captação de água, mas não foi detectada genotoxicidade. Os pontos não diferiram com relação ao CS, mas apresentaram genotoxicidade e com relação ao TCA houve genotoxicidade e menor alteração na captação quando comparado ao ponto de descarte.

Na piscicultura rio Dourados no verão houve menor alteração (TCA) no tanque 1 quando comparado ao descarte, sendo que o ponto de descarte apresentou genotoxicidade. Os pontos de coleta não diferiram com relação aos demais índices nem apresentaram toxicidade com relação aos testes realizados com *Astyanax lacustris*.

Os resultados dos ensaios biológicos de *Allium cepa* e *Astyanax lacustris* referentes à comparação entre os períodos de inverno e verão para cada ponto de coleta nas duas pisciculturas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Índice Mitótico (IM), Índice de morte celular (IMC), Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de mutagenicidade (IMT) em células meristemáticas de *Allium cepa*, e, número médio de Células danificadas multiplicadas pelo grau de dano (CS), Células com cometa (TCA), Índice de genotoxicidade (IG), número médio de Micronúcleos (MCN) em *Astyanax lacustris* em cada ponto de coleta nas pisciculturas em períodos de inverno e verão.

	Ponto	Coleta	<i>Allium cepa</i>				<i>Astyanax lacustris</i>			
			IM	IMC	IAC	IMT	IG	MCN	CS	TCA
Piscicultura Rio Brilhante	¹ CAB	Verão	53,04±1,26 b	0,00±1,00 a	0,45±1,45 a	0,00±1,00 a	0,21±2,17 a	0,18±2,44 a	167,60±4,49 a	51,20±3,79 a
		Inverno	68,98±1,20 a	0,00±1,00 a	0,80±1,65 a	0,02±1,00 a	0,32±3,65 a	0,03±1,00 a	106,80±1,15 a	35,20±1,13 a
	² T1B	Verão	30,39±1,15 b	0,02±1,00 a	0,28±1,58 a	0,04±1,00 a	0,43±1,51 a	0,14±2,26 a	248,40±1,46 a	75,80±1,38 a
		Inverno	63,11±1,08 a	0,00±1,00 a	0,30±2,01 a	0,00±1,00 a	0,36±3,39 a	0,01±1,00 b	272,40±1,13 a	88,40±1,12 a
	³ T2B	Verão	46,50±1,43 a	0,00±1,00 a	0,21±1,74 a	0,06±1,66 a	-	-	281,20±1,14 a	92,60±1,13 a
		Inverno	56,86±1,19 a	0,09±1,00 a	0,59±1,85 a	0,00±1,00 a	0,27±4,63	0,01±1,00	48,20±1,00 b	15,40±1,00 b
	⁴ TDB	Verão	47,83±1,25 b	0,05±1,41 a	0,15±2,32 b	0,02±1,00 a	0,94±1,32 a	0,08±3,96 a	292,00±1,14 a	92,80±1,08 a
		Inverno	72,88±1,06 a	0,08±1,00 a	0,74±2,20 a	0,04±1,00 a	0,07±2,00 b	0,00±1,00 a	305,80±1,10 a	96,60±1,03 a
Piscicultura Rio Dourados	⁵ CAD	Verão	32,05±1,17 b	0,02±1,00 a	0,30±2,78 a	0,05±1,63 a	-	-	-	-
		Inverno	62,32±1,23 a	0,02±1,00 a	0,83±1,80 a	0,00±1,00 a	1,40±2,90	0,02±1,00	260,00±1,70	82,80±1,27
	⁶ T1D	Verão	60,25±1,20 a	0,00±1,00 a	1,05±2,92 a	0,15±2,18 a	-	-	75,60±1,31 b	29,40±1,37 b
		Inverno	56,13±1,21 a	0,00±1,00 a	0,21±1,41 a	0,03±1,04 a	0,63±1,80	0,00±1,00	298,60±1,05 a	99,80±1,09 a
	⁷ T2D	Verão	54,11±1,22 a	0,00±1,00 a	0,70±3,29 a	0,07±1,00 a	0,56±1,51 a	0,04±1,54 a	100,20±3,12 b	38,00±1,84 a
		Inverno	60,62±1,15 a	0,00±1,00 a	0,17±1,45 a	0,02±1,00 a	1,00±1,67 a	0,00±1,00 a	276,80±1,19 a	82,00±1,14 a
	⁸ TDD	Verão	42,28±1,88 a	0,07±1,00 a	0,97±2,64 a	0,00±1,00 a	-	-	84,20±1,64 b	48,60±1,46 b
		Inverno	60,51±1,34 a	0,00±1,00 a	0,53±1,63 a	0,05±1,09 a	0,64±3,68	0,01±1,00	247,20±1,37 a	81,00±1,28 a

⁶Valores seguidos de mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Mann Whitney a 5% de significância. ¹Tanque de captação piscicultura Rio Brilhante (CAB), ² tanque 1 piscicultura Rio Brilhante (T1B), ³ tanque 2 piscicultura Rio Brilhante (T2B), ⁴tanque descarte piscicultura Rio Brilhante (TDB), ⁵Tanque de captação piscicultura Rio Dourados (CAD), ⁶tanque 1 piscicultura Rio Dourados (T1D), ⁷ tanque 2 piscicultura Rio Dourados (T2D), ⁸ tanque descarte piscicultura Rio Dourados (TDD), - ausência de dados para o período.

Na piscicultura Rio Brilhante para o ponto T2B não foi verificada diferença entre os períodos de coleta com relação ao índice mitótico, já para os pontos CAB, T1B e TDB verificou-se maior IM no inverno. E, na piscicultura Rio Dourados verificou-se maior IM no inverno para o ponto CAD, sendo que os pontos T1D, T2D e TDD não diferiram com relação aos períodos de coleta.

Com relação ao IMC e IMT não foi observada diferença entre os períodos de inverno e verão nos pontos das duas pisciculturas e para IAC observou-se mais alterações no inverno no ponto TDB e nos demais pontos não foi observado diferença estatística.

Em relação aos testes com *Astyanax lacustris* verificou-se na piscicultura rio Brilhante maior IG no ponto TDB no verão, maior MCN no ponto T1B no verão e maiores CS e TCA no verão para o ponto T2B. Na piscicultura rio Dourados observou-se maior TCA no inverno para todos os pontos T1D e TDD, e maior CS no inverno para T1D, T2D e TDD.

Os resultados referentes ao teste de *Salmonella*/microsoma no período de inverno para cada ponto de coleta nas duas pisciculturas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Resultados obtidos no teste de *Salmonella*/microsoma em razão de mutagenicidade (RM) para os pontos de coletadas duas pisciculturas com as linhagens TA98 e TA100 de *S. Typhimurium* na presença e ausência de ativação metabólica em período de inverno.

	Ponto	TA 98		TA 100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Piscicultura Rio Brilhante	CAB ¹	■	■	■	■
	T1B ²	■	■	■	■
	T2B ³	■	■	■	■
	TDB ⁴	■	□	□	■
Piscicultura Rio Dourados	CAD ⁵	■	□	■	■
	T1D ⁶	■	■	■	■
	T2D ⁷	■	■	□	■
	TDD ⁸	□	■	■	■

¹Tanque de captação piscicultura Rio Brilhante (CAB), ²tanque 1 piscicultura Rio Brilhante (T1B), ³tanque 2 piscicultura Rio Brilhante (T2B), ⁴tanque descarte piscicultura Rio Brilhante (TDB), ⁵Tanque de captação piscicultura Rio Dourados (CAD), ⁶tanque 1 piscicultura Rio Dourados (T1D), ⁷tanque 2 piscicultura Rio Dourados (T2D), ⁸tanque descarte piscicultura Rio Dourados (TDD).

Legenda:

Tóxica (RM<0,7) □ Negativa (RM<2,0) ■ Positiva (RM>2,0) ■

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6 pode ser observado na piscicultura Rio Brilhante com a linhagem TA98 sem ativação metabólica que a água apresentou mutagenicidade tanto na captação quanto no descarte. Analisando os resultados da mesma linhagem na presença de ativação metabólica percebeu-se que ao entrar na piscicultura a amostra de água era mutagênica e ao ser descartada a água era tóxica.

Já para a linhagem TA 100 na piscicultura Rio Brilhante sem ativação metabólica a água ao ser captada não apresentou atividade mutagênica e ao ser descartada apresentou toxicidade. Na presença de ativação metabólica a água entrou na piscicultura sem apresentar mutagenicidade e foi descartada apresentando mutagenicidade.

Os resultados da piscicultura Rio Dourados com a linhagem TA98 sem ativação metabólica indicaram que a água apresentou mutagenicidade na captação e toxicidade

no descarte. Analisando os resultados da mesma linhagem na presença de ativação metabólica percebeu-se que a água era tóxica na captação e mutagênica no descarte.

Analisando os resultados da linhagem TA 100 na piscicultura Rio Dourados sem ativação metabólica a água ao ser captada apresentou atividade mutagênica e ao ser descartada não apresentou mutagenicidade. Na presença de ativação metabólica a água captada e descartada não apresentou mutagenicidade.

Com relação às condições climáticas verificou-se que a temperatura do ar e pluviosidade foram mais elevadas no verão (25.04 °C e 8.49 mm respectivamente) quando comparadas ao período de inverno (19.84°C e 1.79 mm, respectivamente). Para ambos períodos de coleta a umidade relativa foi similar.

Quanto aos parâmetros físico-químicos no período do inverno as duas pisciculturas estavam em acordo com o estabelecido pelo CONAMA 357/2005 (pH 6,0 a 9,0 mV, oxigênio dissolvido = ou >5,0 mg/L e condutividade <100 µS/cm, respectivamente).

No entanto para o período do verão, as duas pisciculturas apresentaram condutividade em acordo com o permitido pelo CONAMA 357/2005. Na piscicultura rio Brillante verificou-se que ao ser captada a água estava com níveis de oxigênio dissolvido de acordo com o permitido pelo CONAMA (5,07 mg/L) e ao ser descartada apresentava valores abaixo do permitido (4,02 mg/L). Na piscicultura rio Dourados, a água apresentou pH em acordo com o estabelecido pelo CONAMA ao ser captada (6,80 mV) e ao ser descartada apresentou pH ácido (5,33 mV).

Os resultados referentes à determinação de metais na água estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7- Determinação de metais em água de pisciculturas e comparação com valores recomendados pelo CONAMA (resolução nº 357/2005) e EPA (United States Environmental Protection Agency) para toxicidade aguda e crônica.

	Pontos	Metais (mg/L)			
		Al	Cu	Fe	Ni
Piscicultura Rio Dourados	¹ CAD	ND	0.013±0.0000	0.2380±0.0017	ND
	² T1D	ND	0.0017±0.0003	0.2084±0.0002	ND
	³ T2D	ND	0.0023±0.0004	0.5987±0.0007	ND
	⁴ TDD	ND	0.0017±0.0003	1.6686±0.0095	ND
	⁵ CAB	ND	0.0192±0.0001	0.0215±0.0014	0.2238±0.0022
	⁶ T1B	0.0852±0.0016	0.0037±0.0007	0.5971±0.0012	0.0030±0.0021
	⁷ T2B	0.1023±0.0027	0.0043±0.0007	0.7349±0.0001	ND
	⁸ TDB	0.3826±0.0045	0.0039±0.0012	1.0159±0.0036	ND
CONAMA		0,10	0,009	0,30	0,025
⁹ EPA (toxicidade aguda)		0,75	-	-	0,47
⁹ EPA (toxicidade crônica)		0,087	-	1,00	0,052

Não detectado (ND), ¹ Tanque de captação piscicultura Rio Dourados (CAD), ² tanque 1 piscicultura Rio Dourados (T1D), ³ tanque 2 piscicultura Rio Dourados (T2D), ⁴ tanque descarte piscicultura Rio Dourados (TDD), ⁵ Tanque de captação piscicultura Rio Brillante (CAB), ⁶ tanque 1 piscicultura Rio Brillante (T1B), ⁷ tanque 2 piscicultura Rio Brillante (T2B), ⁸ tanque descarte piscicultura Rio Brillante (TDB). ⁹ Valores permitidos para EPA (2016), toxicidade aguda e crônica baseados em critérios para vida aquática, - sem valor estabelecido.

Para cobalto, cromo, manganês e zinco não foram observados valores em desacordo com o permitido pelo CONAMA e EPA (2016). Com relação a alumínio foi observado níveis acima do permitido pelo CONAMA e EPA (toxicidade crônica) no descarte da piscicultura rio Brillante, sendo que na captação não foi detectado. Na

piscicultura Rio Dourados não foi detectado alumínio e para ambas as pisciculturas não foi observado a presença de cádmio.

Para cobre foi verificado que as duas pisciculturas apresentavam níveis acima do permitido pelo CONAMA na captação de água e no descarte níveis em acordo com o permitido. Para o elemento ferro, também foi verificado que as duas pisciculturas apresentavam níveis acima do permitido pelo CONAMA e EPA (toxicidade crônica) ao ser descartada e níveis dentro do permitido na captação de água.

Não foi detectado níquel nos pontos da piscicultura rio Dourados, já na piscicultura rio Brilhante foi detectado níquel acima do permitido pelo CONAMA e EPA (toxicidade crônica) na captação sendo que no descarte não foi detectado.

A Tabela 8 apresenta os resultados referentes à análise de contaminantes emergentes na água das pisciculturas.

Tabela 8 - Análise de contaminantes emergentes nas amostras de água das pisciculturas rio Dourados e Brilhante.

Contaminantes emergentes (ng/L)	Limite de detecção	Limite de quantificação	Piscicultura Rio Dourados				Piscicultura Rio Brilhante			
			¹ CAD	² T1D	³ T2D	⁴ TDD	⁵ CAB	⁶ T1B	⁷ T2B	⁸ TDB
Cafeína	6,0	19,8	46,80	22,50	<MQL	<MQL	88,90	32,40	<MQL	24,90
Imidacloprido	5,3	17,4	<MQL	34,90	80,30	30,80	<MQL	<MQL	<MQL	20,00
Carbendazim	2,7	8,8	<MDL	<MQL	<MQL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
2-Hidroxi atrazina	2,7	9,0	19,60	27,40	27,40	23,10	20,60	<MQL	67,20	202,20
Hexazinona	2,5	8,1	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Tebutiuron	3,0	9,9	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Atrazina	3,9	12,8	<MDL	<MQL	<MQL	<MQL	<MQL	<MDL	53,90	132,30
Clomazona	1,5	4,8	<MQL	<MDL	<MQL	<MDL	<MQL	<MDL	<MDL	<MDL
Malation	2,9	9,5	<MDL	<MQL	<MDL	<MDL	<MQL	<MDL	<MDL	<MDL
Bisfenol A	9,0	29,7	21,70	24,90	16,80	19,20	22,70	30,60	13,80	6,30

Menor que o limite de detecção (<MDL), menor que o limite de quantificação (<MQL), ¹ Tanque de captação piscicultura Rio Dourados (CAD), ² tanque 1 piscicultura Rio Dourados (T1D), ³ tanque 2 piscicultura Rio Dourados (T2D), ⁴ tanque descarte piscicultura Rio Dourados (TDD), ⁵ Tanque de captação piscicultura Rio Brilhante (CAB), ⁶ tanque 1 piscicultura Rio Brilhante (T1B), ⁷ tanque 2 piscicultura Rio Brilhante (T2B), ⁸ tanque descarte piscicultura Rio Brilhante (TDB).

Os contaminantes simazina, carbofurano, diuron, ametrina, testosterona, tebuconazole, progesterona, estriol, 17 α -etinilestradiol, fipronil, triclosan e octilfenol não foram detectados nas amostras de água dos pontos de coleta das duas pisciculturas.

Por meio da análise de contaminantes emergentes foi detectado cafeína, imidacloprido, 2-hidroxi atrazina e bisfenol A nas duas pisciculturas tanto na captação quanto no descarte de água.

Na piscicultura Rio Brilhante foi detectado atrazina tanto na captação de água quanto no descarte, e clomazona e malation na captação.

Na piscicultura Rio Dourados foi detectado hexazinona e tebutiuron na captação e descarte de água, clomazona na captação e atrazina no descarte. Malation não foi detectado na captação e descarte de água, mas foi detectado no tanque 1. E, foi encontrado carbendazim nos tanques 2 e 3 da piscicultura rio Dourados.

4 Discussão

Os resultados referentes a uso e ocupação do solo, na piscicultura Rio Dourados, indicaram elevada proporção ocupada por fragmentos florestais (32,13%), seguida de agricultura (26,42%) e solo exposto (16,31%). A piscicultura Rio brilhante apontou ocupação para atividades de agricultura (48,02%) e pastagem (38,95%) seguida de

fragmentos florestais (7,19%). A ocupação do solo por fragmentos florestais auxilia na conservação da biodiversidade e na manutenção da qualidade dos recursos hídricos (Costa et al. 2014). Entretanto, a exposição do solo, existência de pastagens e as atividades agrícolas podem influenciar negativamente a qualidade do solo e da água. O solo exposto está sujeito a intempéries promovendo a degradação, e, dependendo de sua declividade pode ocorrer lixiviação, erosão ou compactação (Schoonover e Crim 2015). A ocupação do solo por pastagem relacionada à criação de gado com consequente pisoteamento e compactação do solo, pode ocasionar em redução da cobertura vegetal nativa e prejudicar os recursos hídricos e comunidades aquáticas (Boughton et al. 2016; Pulido et al. 2016). Os compostos utilizados em atividades agrícolas podem causar a contaminação do solo, podendo ser lixiviados para águas subterrâneas ou escoadas para águas superficiais, sendo depositados nos sedimentos de córregos ou rios (Yang et al. 2012; Grossberger et al. 2014). Assim sendo, ambas pisciculturas estão sujeitas a contaminação por compostos provenientes de atividades agrícolas, e aos impactos causados pela pastagem e solo exposto.

Com base nos resultados das Tabelas 3, 4 e 6 foi possível observar diferença quanto a mutagenicidade e genotoxicidade entre águas provenientes de tanques de captação e descarte em ambas pisciculturas. No período do inverno, o teste de *Salmonella*/microsoma com a linhagem TA 100 na ausência e presença de ativação metabólica indicou toxicidade e mutagenicidade, respectivamente, no descarte de água (PRB). Para o ensaio do Cometa, os danos no DNA foram significativamente superiores no descarte da PRB no inverno, e no descarte das duas pisciculturas no verão. O uso de antibióticos, hormônios e a liberação de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) oriundos da ração e excretas dos peixes, promovem o acúmulo de resíduos químicos na água dos tanques de pisciculturas, podendo causar toxicidade aos organismos aquáticos (Figueiredo e Leal 2008; Kalantzi et al. 2013; Harnisz et al. 2015). Dessa forma, a atividade de piscicultura compromete os recursos hídricos e pode causar prejuízos a biota aquática (Cardoso et al. 2016). Os padrões diferenciais quanto às alterações genéticas identificadas nos tanques de descarte das pisciculturas quando comparados aos tanques de captação de água podem ser resultantes do efeito da atividade piscícola.

A atividade agrícola está relacionada ao uso de herbicidas, inseticidas e fungicidas. O uso de tais contaminantes orgânicos pode ocasionar a poluição de águas superficiais e riscos a organismos expostos (Lari et al. 2014; Petrie et al. 2014; Thomaidi et al. 2015). Considerando as proximidades de tais atividades nas PRD e PRB indicada pelo uso e ocupação do solo, isso pode implicar em contaminação desde as áreas de captação de água. Os resultados do teste de *Salmonella*/microsoma indicaram atividade mutagênica no tanque de captação nas PRD e PRB. O ensaio do cometa demonstrou genotoxicidade desde a captação de água na PRB no verão e na PRD no período do inverno. A mutagenicidade e genotoxicidade observadas desde áreas de captação de água nas pisciculturas podem ter sido determinadas pelas atividades agrícolas indicadas na análise de uso e ocupação do solo.

Além disso, os resultados do teste de *Salmonella*/microsoma, indicaram atividade mutagênica tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica. Tais resultados podem demonstrar presença de substâncias mutagênicas com ação direta nas amostras de água que independem da ativação metabólica e de substâncias que dependem da ativação metabólica (Kummrow et al. 2006). As alterações genéticas observadas em áreas de captação e descarte de água das pisciculturas podem estar relacionadas aos compostos químicos utilizados nas atividades agrícolas e na própria

atividade de piscicultura. A toxicidade da água proveniente da atividade piscícola ressalta a importância do tratamento de seus efluentes antes de descartá-los em rios.

A comparação dos períodos de coleta em cada ponto (Tabela 5) revelou, que no período do inverno, houve maiores valores de índice mitótico em ambas pisciculturas. E, nesse período o índice de alterações cromossômicas na PRB pelo Teste de *Allium cepa*, e genotoxicidade na PRD pelo ensaio do cometa com *A. lacustris* foram mais elevados que no verão. Tais resultados podem estar relacionados a diferença na taxa pluviométrica observada entre os períodos de coleta. No período de inverno houve menor taxa de pluviosidade (1.79 mm) quando comparado ao período do verão (8.49 mm). A baixa pluviosidade pode influenciar na concentração de macro e micronutrientes nos corpos hídricos, oriundos da atividade de piscicultura, e de compostos químicos utilizados em atividades agrícolas (Herbeck et al. 2013; Schinasi e Leon 2014). A menor taxa de pluviosidade no inverno pode ter ocasionado o aumento da concentração de nutrientes e contaminantes provenientes da atividade piscícola e agrícola nos corpos hídricos. Esse aumento da concentração de nutrientes e poluentes pode ter causado a elevação do índice mitótico e de alterações cromossômicas resultantes do teste com modelo vegetal, e da genotoxicidade oriunda do ensaio do cometa com modelo animal.

Entretanto, os ensaios com *Astyanax lacustris* apresentaram maiores valores de IG, MCN, CS e TCA no verão na piscicultura Rio Brilhante. Neste período foram observados níveis de oxigênio dissolvido abaixo do permitido pelo CONAMA (Tabela 1) nos pontos T1B, T2B e TDB desta piscicultura. Isso pode ter ocorrido devido à pluviosidade mais elevada neste período quando comparado ao inverno, ocasionando maior lixiviação de compostos químicos e nutrientes para a água. Durante períodos chuvosos, o deslocamento de água nos corpos hídricos, bem como o transporte e ressuspensão de poluentes e nutrientes ocorre rapidamente (Malham et al. 2014; Sarria-Villa et al. 2015). Altas concentrações de nutrientes na água ocasionam crescimento demasiado de algas, plantas aquáticas, bactérias e fungos heterotróficos. Isso pode resultar na redução dos níveis de oxigênio dissolvido na água devido ao aumento das atividades metabólicas desses organismos (Eruola et al. 2015; Rook et al. 2015). Dessa forma, a concentração de poluentes nos corpos hídricos ocasionada pela velocidade com que a água é movimentada, bem como a toxicidade causada por estes compostos aos organismos expostos nas pisciculturas são determinadas pela taxa pluviométrica.

Considerando as propriedades mutagênicas e genotóxicas identificadas pelas análises biológicas, os resultados das análises químicas evidenciados à posteriori indicaram a existência de contaminação por metais e contaminantes emergentes nas amostras de água das pisciculturas. A presença desses contaminantes na água pode estar associada a mutagenicidade e genotoxicidade identificados no presente estudo.

A existência de metais e contaminantes emergentes nas amostras de água pode estar associada às atividades agrícolas e ocupações humanas existentes no entorno das pisciculturas, e, à própria atividade piscícola. A presença do metal níquel acima dos limites estabelecidos pelo CONAMA e EPA na captação da PRB e dos contaminantes imidacloprido, 2-hidroxi atrazina, carbendazim, atrazina, clomazona, malation, hexazinona e tebutiuron nas amostras de água das pisciculturas pode ser oriunda da agricultura. Corbi et al. (2006) demonstraram a presença de níquel em amostras de sedimentos de córregos próximas à áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Os herbicidas clomazona, tebutiuron, hexazinona, atrazina e 2-hidroxi atrazina, os inseticidas malation e imidacloprido, e o fungicida carbendazim são utilizados durante as práticas agrícolas (Tofoli et al. 2009; Carmo et al. 2013; Singh et al. 2013; Martins et al. 2014; Silva et al.

2014; Oliveira et al. 2016; ALAMOSBRASIL 2017). Dessa forma, a agricultura contribui de maneira expressiva na poluição da água por contaminantes orgânicos e inorgânicos.

Entretanto, a presença dos compostos cafeína e bisfenol A nas amostras de água, pode ser atribuída as edificações observadas no entorno das duas pisciculturas. A cafeína encontrada nas amostras de água não apresenta riscos aos organismos expostos, mas está relacionada a contaminação por esgoto doméstico e pode indicar a presença de outros contaminantes na água (Sodré et al. 2010), como o bisfenol A, composto utilizado na fabricação de plásticos (Makinwa e Uadia 2017; Vandenberg et al. 2009). Isso demonstra que fontes antropogênicas contribuem de maneira expressiva na contaminação dos recursos hídricos.

Os metais alumínio, cobre e ferro encontrados em concentrações acima do estabelecido pela legislação (CONAMA e EPA) nas amostras de água, são provenientes da própria atividade de piscicultura. O alumínio é utilizado na remoção de nutrientes da água de pisciculturas, de modo a reduzir o crescimento de plâncton e algas nos viveiros (Queiroz e Silveira 2006). Os elementos cobre e ferro são suplementados na ração de peixes, pois são minerais essenciais na sua dieta (Watanabe et al. 2007). Contudo, o alumínio foi verificado nos três últimos pontos (T1B, T2B e TDB) da piscicultura Rio Brillhante (PRB), o que pode ser atribuído a este local estar ocupado predominantemente pela agricultura (48,02%) quando comparado à piscicultura Rio Dourados (PRD) (26,42%). Produtos químicos utilizados na agricultura podem ser lixiviados para os corpos hídricos, como o silicato de alumínio, que é utilizado para auxiliar no desenvolvimento de plantas (Castro et al. 2016). Desse modo, as atividades agrícolas e piscícolas contribuíram para a presença de metais e contaminantes emergentes nas amostras de água.

Os metais cobre e níquel podem ser tóxicos dependendo da concentração, e causar genotoxicidade em peixes (Porto e Ethur 2009; Palermo 2012; Harabawhy e Mosleh 2014; Kousar e Javed 2015). A exposição ao alumínio, dependendo da concentração, pode acarretar em riscos para organismos expostos. O alumínio é um elemento neurotóxico e pode causar a contaminação de ambientes aquáticos (Vilches 2009; Zhang et al. 2014). A presença do metal ferro também pode ser atribuída à contaminação do ambiente aquático. Kieling-Rubio et al. (2015) associaram a genotoxicidade apresentada pela água de riachos à concentrações de ferro acima dos limites estabelecidos pela legislação. As concentrações dos metais Al, Cu, Fe e Ni evidenciados nas amostras de água das pisciculturas em desacordo com o estabelecido pela legislação para corpos de água destinados a aquicultura e criação de peixes, podem ter ocasionado a toxicidade observada na água das pisciculturas.

Além dos metais, os contaminantes emergentes estão associados a mutagenicidade e genotoxicidade da água. A presença do contaminante clomazona em amostras de água pode estar associada à danos genotóxicos e mutagênicos detectados pelo Teste de *Allium cepa* (Silva et al. 2013). Kumar et al. (2010) identificaram genotoxicidade pelo Ensaio do Cometa, e, mutagenicidade pela presença de micronúcleos em células de peixes expostos ao inseticida malation. Mutagenicidade e genotoxicidade foram observadas em organismos expostos ao inseticida imidacloprido (Karabay e Oguz 2005; Kumar et al. 2013; Iturburu et al. 2016). O herbicida atrazina pode ocasionar problemas ambientais e genotoxicidade em peixes. Sua degradação está relacionada à formação de 2-hidroxi atrazina (Fu et al. 2013; Carmo et al. 2013; Nwani et al. 2014; Campos et al. 2017). O composto hexazinona pode apresentar genotoxicidade a organismos aquáticos e potencialidade cancerígena (Martins et al.

2014; Franco-Bernardes et al. 2015). Franco-Bernardes et al. (2014) avaliaram os efeitos bioquímicos e genéticos do tebutiuron em *Oreochromis niloticus* e evidenciaram que este herbicida pode provocar genotoxicidade em peixes. O fungicida possui potencial mutagênico e carcinogênico (Silva et al. 2014). Spadoto (2013) observou em seus estudos que o bisfenol A pode apresentar risco ambiental elevado e toxicidade à organismos aquáticos de água doce. Segundo Zhou et al. (2016), concentrações de bisfenol A como 228 ng/L podem causar toxicidade aos organismos expostos. Contudo, os resultados referentes à concentração de bisfenol A no presente trabalho foram inferiores a esta concentração. Assim sendo, as alterações genéticas detectadas pelos ensaios utilizados no presente estudo podem estar relacionadas tanto à presença de metais (Al, Cu, Ni, Fe) acima dos limites permitidos pela legislação, quanto à presença de contaminantes emergentes (imidacloprido, 2-hidroxi atrazina, carbendazim, atrazina, clomazona, malation, hexazinona, tebutiuron, bisfenol A) detectados à posteriori nas amostras de água das pisciculturas. Este fato ressalta a importância do descarte adequado de resíduos de agrotóxicos e da conscientização no uso dos mesmos, para que não contaminem os corpos hídricos. As construções de barreiras físicas bem como o aumento da área de vegetação funcionam como barreira natural e dificultam a chegada dos resíduos químicos aos corpos hídricos.

5 Conclusão

Os ensaios ecotoxicológicos possibilitaram identificar genotoxicidade e mutagenicidade nas amostras de água das pisciculturas. As alterações genéticas evidenciadas podem ter sido ocasionadas por contaminantes químicos oriundos de atividades agrícolas praticadas no entorno das pisciculturas, e da própria atividade piscícola. Desta forma, considerando que águas contaminadas perturbam a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas naturais, o presente estudo revelou a importância do uso consciente dos agrotóxicos e do tratamento dos efluentes de pisciculturas, de forma a minimizar os impactos negativos decorrentes dessa atividade nas bacias dos rios Dourados e Brilhante.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, Me. Lucilene Finoto Viana pelo auxílio durante as análises estatísticas, Julio César Jut Solórzano pelo auxílio na análise de uso e ocupação do solo, e, aos doutores Yzel Rondon Suárez e Lilian Silvia Cândido por todo auxílio durante a execução do trabalho.

Referências

Acayaba, R. D. (2015). *Ocorrência de agrotóxicos usados na cana de açúcar em corpos de água do Estado de São Paulo: subsídios para avaliação de risco para vida aquática*. Dissertação. Faculdade de Tecnologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ALAMOSBRASIL. (2017). Agroquímicos. Disponível em: <http://alamosbrasil.com.br/produtos?prd=52.pdf>. Acessado em 15 de maio de 2017.

- Batista, A. (2013). *A contribuição da piscicultura para as pequenas propriedades rurais em Dourados-MS*. Dissertação. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCain, J., Pike, M. C. (1982). An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutation Research*, 97(4), 267-281.
- Boughton, E. H., Quintana-Ascencio, P. F., Bohlen, P. J., Fauth, J. E., Jenkins, D. G. (2016). Interactive effects of pasture management intensity, release from grazing and prescribed fire on forty subtropical wetland plant assemblages. *Journal of Applied Ecology*, 53, 159-170.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S. (2014). Handbook for aquaculture water quality. Handbook for Aquaculture Water Quality. p.439.
- Bucker, A., Carvalho, W., Alves-Gomes, J. A. (2006). Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*, 36 (3): 354-364.
- Campos, F. A., Aguiar, A. C. R., Medeiros, V. S., Branquinho, A. C., Silva, F. C. B., Andrade, R. D. A., Chaves, A. R. (2017). Degradação fotocatalítica de atrazina na presença de catalisadores nanoparticulados. *Química Nova*, 40 (1): 36-41.
- Cardoso, A. S., El-Deir, S. G., Cunha, M. C. C. (2016). Bases da sustentabilidade para atividade de piscicultura no semiárido de Pernambuco. *Interações*, 17(4): 645-653.
- Carmo, D. A., Carmo, A. P. B., Pires, J. M. B., Oliveira, J. L. M. (2013). Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Revista Ambiente & Água*, 8(1): 133-143.
- Castro, E. B., Santos, L. D. T., Fernandes, L. A., Tajima, C. Y. (2016). Silicato de Alumínio em Substrato para Produção de Mudanças de *Corymbia citriodora*. *Floresta e Ambiente*, 23(2): 229-236.
- Christofoletti C. A., Pedro-Escher, J., Fontanetti, C.S. (2013). Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay, *Water, Air & Soil Pollution*, 224(1523): 1-14.
- CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução 357/2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acessado em: 19 de junho de 2017.
- Corbi, J. J., Strixino, S.T., Santos, A., Del Grande, M. (2006). Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). *Química Nova*, 29, 61-65.
- Costa, C. C., Gomes, L. J., Almeida, A. P. (2014) Seleção de indicadores de sustentabilidade em fragmentos florestais de Mata Atlântica na bacia hidrográfica do Rio Poxim-SE por meio do geoprocessamento. *REGET*, 18(1): 209-219.
- Costa, R. M. A., Menk, C. F. M. (2012). Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 24-26.
- Dotti, A., Valejo, P. A. P., Russo, M. R. (2012). Licenciamento ambiental na piscicultura com enfoque na pequena propriedade: uma ferramenta de gestão ambiental. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 3(1): 6-16.
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2012) Pesquisas em aquicultura podem mudar cenários produtivos em Mato Grosso do Sul. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1464102/pesquisas-em-aquicultura-podem-mudar-cenarios-produtivos-em-ms.pdf>. Acessado em 10 de junho de 2017.

Eruola, A. O., Ojekunle, Z. O., Amori, A. A., Awomeso, J. A., Amole O. E., Anthony, D. E. (2015). Assessment of Nutrient Concentration in Sokori River, Southwest Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 19(3) 447-450.

Farias, J. F., Silva, E. V., Rodriguez, J. M. M. (2013). Aspectos do Uso e Ocupação do Solo no Semiárido Cearense: Análise espaço temporal (1985 - 2011) sob o viés da Geoecologia das Paisagens. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 6(2): 136-147.

Figueiredo, H. C. P., Leal, C. A. G. (2008). Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 8-14.

Franco-Bernardes, M. F., Maschio, L. R., Azeredo-Oliveira, M. T. V., Almeida, E. A. (2014). Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebutiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 9(1): 59-67.

Franco-Bernardes, M. F., Maschio, L. R., Azeredo-Oliveira, M. T. V., Almeida, E. A. (2015). The use of biomarkers to study the effects of the mixture of diuron and hexazinone on small and large *O. niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 10(1): 83-92.

Fu, Y., Li, M. C., Liu, C., Qu, J. P., Zhu, W. J., Xing, H. J., Xu, S. W., Li, S. (2013). "Effect of atrazine and chlorpyrifos exposure on cytochrome P450 contents and enzyme activities in common carp gills". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 28-36.

Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*, 185, 168-177.

Harabawy, A. S. A., Mosleh, Y. Y. I. (2014). The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cádmium, copper, lead and zinco n erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 28-35.

Harnisz, M., Korzeniewska, E., Golás, I. (2015). The impact of a freshwater fish farm on the community of tetracycline-resistant bacteria and the structure of tetracycline resistance genes in river water. *Chemosphere*, 128, 134-141.

Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., McGregor, J. T., Newell, G. W., Salamone, N. F. (1983) The induction of micronuclei as a measure genotoxicity. *Mutation Research*, 123, 61-118.

Herbeck, L. S., Unger, D., Wu, Y., Jennerjahn, T. C. (2013). Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research*, 57, 92-104.

Iturburu, F. G., Zomisch, M., Panzeri, A. M., Crupkin, A. C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Menone, M. L. (2016). Uptake, distribution in diferente tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9999, 1-10.

Kado, N. Y., Langley, D., Eisenstadt. (1983). A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. *Mutation Research* 121, 25-32.

Kalantzi, I., Shimmield, T. M., Pergantis, A. S., Papageorgiou, N., Black, K. D., Karakassis, I. (2013). Heavy metals, trace elements and sediment geochemistry at four Mediterranean fish farms. *Science of the Total Environment*, 444, 128-137.

- Karabay, N. U., Oguz, M. G. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides imidacloprid and methamidophos. *Genetics and Molecular Research*, 4(4): 653-662.
- Kieling-Rubio, M. A., Benvenuti, T., Costa, G.M., Petry, C. T., Rodrigues, M. A. S., Schmitt, J. L. (2015). Integrated Environmental Assessment of streams in the Sinos River basin in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 75(2): 105-113.
- Kousar, S., Javed, M. (2015). Studies on Induction of Nuclear Abnormalities in Peripheral Blood Erythrocytes of Fish Exposed to Copper. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 879-886.
- Kumar, A., Sharma, K., Tomar, M., Malik, V., Kataria, S. K. (2013). Determination of Mutagenic Potential of Imidacloprid in Salmonella Typhimurium–TA 98 and TA 100 Following Bacterial Reverse Mutation Assay. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(7): 703-710.
- Kumar, R., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Lakra, W.S. (2010). Investigation of the Genotoxicity of Malathion to Freshwater Teleost Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Archives of Environmental Contamination*, 58: 123-130.
- Kummrow, F., Magalhães, D., Franco, A., Umbuzeiro, G. A. (2006). Blue rayon e teste Salmonella/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. *Revista de Saúde Pública*, 40(5): 890-897.
- Lari, S. Z., Khan, N. A., Gandhi, K. N., Meshram, T. S., Thacker, N. P. (2014) Comparison of pesticide residues in surface water and ground water of agriculture intensive areas. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*., 12(11):1-7.
- Leme, D. M., Marin-Morales, M. A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, 71-81.
- Machado, K. C., Grassi, M. T., Vidal, C., Pescara, I. C., Jardim, R. W., Fernandes, N. A., Sodr e, F. F., Almeida, F. V., Santana, J. S., Canela, M. C., Nunes, C. R. O., Bichinho, K. M., Severo, F. J. R. (2016). A preliminar Nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source Waters in Brazil. *Science of the Total Environment*, 572, 138-146.
- Makinwa, T., Uadia, P. (2017). Occurrence of Bisphenol A (BPA) in Ponds, Rivers and Lagoons in South-Western Nigeria and Uptake in Cat Fish Evidence of Environmental Contamination. *Food and Public Health*, 7(1): 1-6.
- Malham, S. K., Rajko-Nenow, P., Howlett, E., Tuson, K. E., Perkins, T. L., Pallett, D. W., Wang, H., Jago, C. F., Jones, D. L., McDonaldb, J. E. (2014). The interaction of human microbial pathogens, particulate material and nutrients in estuarine environments and their impacts on recreational and shellfish Waters. *Environmental Science Processes & Impacts*, 16, 2145-2155.
- 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, Cuiabá.
- Martins, A. S., Ferreira, T. C. R., Carneiro, R. L., Lanza, M. R. V. (2014). Simultaneous degradation of hexazinone and diuron herbicides by H₂O₂/UV and toxicity assessment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(11): 2000-2006.
- Matsumoto, S. T., Marin-Morales, M. A. (2005). Toxic And Genotoxic Effects Of Trivalent And Hexavalent Chromium - A Review. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 18(1): 77-85.

- Mermet, J., Poussel, E. (1995). ICP Emission Spectrometers: 1995 Analytical Figures of Merit. *Applied Spectroscopy*, 49(10): 12-18.
- Montagner, C. C., Vidal, C., Acayaba, R., D., Jardim, W. F., Jardim, I. C., Umbuzeiro, G. A. (2014). Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in Brazilian surface and drinking waters. *Analytical Methods*, 6, 6668-6677.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W. S. (2014). Induction of micronuclei and nuclear lesions in *Channa punctatus* following exposure to carbosulfan, glyphosate and atrazine. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(4): 370-377.
- Oliveria, C. R., Fraceto, L. F., Rizzi, G. M., Salla, R. F., Abdala, F. C., Costa, M. J., Silva-Zacarin, E. C. M. (2016). Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 149, 304-313.
- Palermo, F. F. (2012). *Bioacumulação e efeitos do níquel em uma espécie de peixe neotropical*. Centro de Ciências Biológicas. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B. (2014). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 1-25.
- Porto, L. C. S., Ethur, E. M. (2009). Elementos traço na água e em vísceras de peixes da Bacia Hidrográfica Butuí-Icamaquã, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 39(9): 2512-2518.
- Pulido, M., Schnabel, S., Contador, J. F. L., Lozano-Parra, J., González, F. (2016) The Impact of Heavy Grazing on Soil Quality and Pasture Production in Rangelands of SW Spain. *Land Degradation & Development*, 1-12.
- Queiroz, J. F., Silveira, M. P., Recomendações práticas para melhorar a qualidade da água e dos efluentes dos viveiros de aquíicultura. Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/aquisys/circular12.pdf>. Acessado em: 19 de junho de 2017.
- Ramsdorf, W. A., Ferraro, M.V. M., Oliveira-Ribeiro, C. A., Cestari, M. M. (2009). Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 158, 77-85.
- Rook, H., Smith, R., Henpita, C. (2015). "Different Levels of Pollutants and Bacteria and How they Effect Dissolved Oxygen Levels in Bodies of Water." *Journal of Introductory Biology Investigations*, 2(4).
- Santos, C. L., Vital, S. R. O. (2016). Formation of processes erosion associated with the use and occupation of soil in the Ribeira river basin, city of Santa Rita / PB. *Revista Geama*, 6(1): 53-66.
- Sarria-Villa, R., Campo-Duque, W., Páez, M., Schuhmache, M. (2015). Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment. *Science of the Total Environment*, 540, 455-465.
- Schinasi, L., Leon, M. E. (2014). Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4): 4449-4527.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*, 31:9-15.

- Schoonover, J. E., Crim, J. F. (2015). An introduction to soil concepts and the role of soils in watershed management. *Journal of Contemporary Water Research & Education*, 154, 21-47.
- Silva, A. R. M., Nogueira, J. M. F. (2008). New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta*, 74, 1498-1504.
- Silva, G. H., Messias, T. G., Leme, D. M., Monteiro, R. T. R. (2013). Mutagenicidade e genotoxicidade em águas superficiais e subterrâneas antes e após o tratamento da água. *HOLUS Environmental*, 13(1): 64-73.
- Silva, R. C., Barros, K. A., Pavão, A. C. (2014). Carcinogenicidade do Carbendazim e seus metabólitos. *Química Nova*, 37(8): 1329-1334.
- Singh, B., Kaur, J., Singh, K. (2013). Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. *Critical Reviews Microbiology*, 1-9.
- Sodré, F. F., Locatelli, M. A. F., Jardim, W. F. (2010). Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water Air & Soil Pollution*, 206, 57-67.
- Souza, C. C. (2014). *Aplicação dos ensaios Salmonella/microsoma e MTT para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e fotocatalise*. Dissertação. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Souza, C. M. A. (2012). Plano Estratégico de Desenvolvimento da Cadeia do Pescado no Território da Grande Dourados, PROCAPTAR/UFOD. Campo Grande – MS. Disponível em: <http://docplayer.com.br/44080203-Plano-estrategico-de-desenvolvimento-da-cadeia-do-pescado-no-territorio-da-grande-dourados-ms.pdf>. Acessado em: 19 de junho de 2017.
- Souza, T. S., Fontanelli, C. S. (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alteration of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affect by refinery effluents. *Mutation Research*, 605, 87-93.
- Spadoto, M. (2013). *Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce*. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Teixeira, P. (2007). Arranjo produtivo da piscicultura da região de Dourados/MS. Dourados, DC: Núcleo Estadual de apoio aos APLs.
- Thomaidi, V. S., Stasinakis, A. S., Borova, V. L., Thomaidis, N. S. (2015). Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 740-747.
- Tofoli, G.R., Velini, E.D., Negrisoni, E., Cavenaghi, A.L., Martins, D. (2009). Dinâmica do tebutiuron em palha de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, 27(4), 815-821.
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S. Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1):75–95.
- Ventura, B. C. (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, Rio Claro.
- Vilches, M. (2009). *Análise genotóxica do rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores*. Dissertação. Universidade Feevale, Novo Hamburgo.
- Watanabe, A., Prezotto, L. D., Gonçalves, L. U., Cabral, N. S., Renan, A. M. (2007). Princípios técnicos de piscicultura. São Paulo, DC: Dossie técnico.

- Yang, Y. Y., Gray, J. L., Furlong, E. T., Davis, J. G., ReVello, R. C., Borch, T. (2012). Steroid hormone runoff from agricultural test plots applied with municipal biosolids. *Environmental Science & Technology*, 46, 2746-2754.
- Zhang, H.; Jiang, Z., Qin, R., Zhang, H., Zou, J., Jiang, W., Liu, D. (2014). Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biology*, 14(264): 1-16.
- Zhou, D., Yang, J., Li, H., Cui, C., Yu, Y., Liu, Y., Lin, K. (2016). The chronic toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* after long-term exposure at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere*, 154, 546-551.

Anexo I

Water, Air, & Soil Pollution

➤ Submissão de manuscrito

A submissão de um manuscrito implica: que o trabalho descrito não tenha sido publicado antes; que não está sob consideração para publicação em qualquer outro lugar; que a sua publicação foi aprovada por todos os co-autores, se houver, bem como pelas autoridades responsáveis (tácita ou explicitamente) no instituto onde o trabalho foi realizado. O editor não será considerado legalmente responsável se houver alguma reivindicação de compensação.

➤ Permissões

Os autores que desejem incluir figuras, tabelas ou passagens de texto que já tenham sido publicados em outro lugar são obrigados a obter permissão do(s) proprietário(s) de direitos autorais, tanto para o formato impresso como on-line, e, incluir evidências de que essa permissão foi concedida ao enviar seus artigos. Qualquer material recebido sem essa evidência será assumido como tendo origem nos autores.

➤ Submissão Online

Por favor, siga o hiperlink "Enviar on-line" à direita e fazer o upload de todos os seus arquivos manuscritos seguindo as instruções dadas na tela.

➤ Folha de rosto

A página de rosto deve incluir:

O (s) nome (s) do (s) autor (es);

Um título conciso e informativo;

A (s) filiação (ões) e endereço (s) do (s) autor (es);

O endereço de e-mail e o (s) número (s) de telefone do (s) autor;

Se disponível, o ORCID de 16 dígitos do (s) autor (es).

➤ Abstract

Forneça um resumo de 150 a 250 palavras. O resumo não deve conter abreviações indefinidas ou referências não especificadas.

➤ Palavras-chave

Forneça 4 a 6 palavras-chave que podem ser usadas para fins de indexação.

➤ Formatação de texto

Os manuscritos devem ser enviados em Word, fonte normal e simples (por exemplo, 10 pontos Times Roman) para texto. Use itálico para ênfase. Utilize a função de numeração automática de páginas para numerar as páginas. Não use funções de campo. Use tabulações ou outros comandos para travessões, não a barra de espaço. Use a função de tabela, não planilhas, para fazer tabelas. Use o editor de equações ou MathType para equações. Salve seu arquivo no formato docx (Word 2007 ou superior) ou no formato doc (versões antigas do Word). Manuscritos com conteúdo matemático também podem ser enviados em LaTeX. Pacote macro LaTeX (zip, 182 kB).

➤ Cabeçalhos

Não use mais de três níveis de títulos exibidos.

➤ Abreviaturas

As abreviaturas devem ser definidas na primeira menção e usadas consistentemente depois disso.

➤ Notas de Rodapé

As notas de rodapé podem ser usadas para fornecer informações adicionais, que podem incluir a citação de uma referência incluída na lista de referências. Eles não devem consistir apenas de uma citação de referência, e eles nunca devem incluir os detalhes bibliográficos de uma referência. Eles também não devem conter quaisquer figuras ou tabelas.

As notas de rodapé do texto são numeradas consecutivamente. As tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos). Notas de rodapé para o título ou os autores do artigo não são dados símbolos de referência.

Sempre use notas de rodapé em vez de notas de fim.

➤ Agradecimentos

Agradecimentos de pessoas, bolsas, fundos, etc devem ser colocados em uma seção separada na página de rosto. Os nomes das organizações de financiamento devem ser escritos na íntegra.

➤ Citação

Cite referências no texto por nome e ano entre parênteses. Alguns exemplos:

A pesquisa de negociação abrange muitas disciplinas (Thompson, 1990).

Este resultado foi posteriormente contradito por Becker e Seligman (1996).

Este efeito foi amplamente estudado (Abbott 1991, Barakat et al., 1995, Kelso e Smith, 1998, Medvec et al., 1999).

➤ Lista de referência

A lista de referências deve incluir apenas as obras citadas no texto e que tenham sido publicadas ou aceitas para publicação. As comunicações pessoais e as obras não publicadas só devem ser mencionadas no texto. Não use notas de rodapé ou notas de fim como um substituto para uma lista de referência.

As entradas da lista de referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelos sobrenomes do primeiro autor de cada obra.

-artigo de jornal

Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P. et ai. (2001). Escrita de laboratórios e a conexão de Hollywood. *Journal of Film Writing*, 44 (3), 213-245.

-Artigo por DOI

Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Implicações clínicas da produção de citocina desregulada. *Journal of Molecular Medicine*, doi: 10.1007 / s001090000086.

-Livro

Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guia para preparar manuscritos para publicação de periódicos*. Washington, DC: Associação Psicológica Americana.

-Capítulo de livro

O'Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Viagens de personagens de gênero para homens e mulheres: Metáfora para cicatrização, transição e transformação. Em B. R. Wainrib (Ed.), *As questões de gênero ao longo do ciclo de vida* (pp. 107-123). Nova York: Springer.

-Documento on-line

Abou-Allaban, Y., Dell, M.L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). *Compromissos religiosos / espirituais e prática psiquiátrica*. Documento de recurso. Associação Psiquiátrica Americana. [Http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf](http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf). Acessado em 25 de junho de 2007.

Os nomes dos periódicos e os títulos dos livros devem estar em itálico.

Para autores que utilizam o EndNote, o Springer fornece um estilo de saída que suporta a formatação de citações no texto e lista de referências. Estilo EndNote (zip, 3 kB).

➤ Tabelas

Todas as tabelas devem ser numeradas usando algarismos arábicos. As tabelas devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva. Para cada tabela, forneça uma legenda de tabela (título) explicando os componentes da tabela.

Identifique qualquer material previamente publicado fornecendo a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.

As notas de rodapé para as tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídas abaixo do corpo da tabela.

➤ Arte final e ilustrações guia

Apresentação eletrônica de figuras:

Forneça todos os números eletronicamente. Indique qual programa de gráficos foi usado para criar a arte. Para gráficos vetoriais, o formato preferido é EPS; Para meios-tons, use o formato TIFF. Arquivos MSOffice também são aceitáveis.

Gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos. Nomeie seus arquivos de figura com "Fig" e o número de figura, por exemplo, Fig1.

➤ Linha Arte

Não use linhas fracas e / ou letras e verifique se todas as linhas e letras dentro das figuras são legíveis no tamanho final. Todas as linhas devem ter pelo menos 0,1 mm (0,3 pt) de largura. Desenhos de linha digitalizados e desenhos de linha no formato bitmap devem ter uma resolução mínima de 1200 dpi.

Gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.

Arte do meio-tom:

Meio-tom-cor-cinza

Definição: Fotografias, desenhos ou pinturas com sombreado fino, etc. Se qualquer ampliação for usada nas fotografias, indique isso usando barras de escala dentro das próprias figuras. Os meios-tons devem ter uma resolução mínima de 300 dpi.

Combinação Arte

Definição: uma combinação de meio-tom e arte de linha, por exemplo, meios-tons que contêm desenhos de linhas, letras extensas, diagramas de cores, etc. Combinação arte deve ter uma resolução mínima de 600 dpi.

➤ Arte da cor

A arte colorida é gratuita para publicação on-line. Se o preto e o branco forem mostrados na versão impressa, certifique-se de que as informações principais ainda estarão visíveis. Muitas cores não são distinguíveis umas das outras quando convertidas em preto e branco. Uma maneira simples de verificar isso é fazer uma cópia xerográfica para ver se as distinções necessárias entre as diferentes cores ainda são aparentes.

Se as figuras forem impressas em preto e branco, não se refira a cor nas legendas.

As ilustrações coloridas devem ser apresentadas como RGB (8 bits por canal).

➤ **Figura de rotulação**

Para adicionar letras, é melhor usar Helvetica ou Arial (fontes sans serif). Mantenha a rotulação consistentemente dimensionada ao longo de sua obra final de tamanho, geralmente cerca de 2-3 mm (8-12 pt). A variação do tamanho do tipo dentro de uma ilustração deve ser mínima, por exemplo, não utilizar um tipo de 8 pt num eixo e um tipo de 20 pt para o rótulo do eixo. Evite efeitos como sombreamento, letras de contorno, etc. Não inclua títulos ou legendas dentro de suas ilustrações.

➤ **Numeração de figuras**

Todas as figuras devem ser numeradas usando algarismos arábicos. As figuras devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva. As partes da figura devem ser indicadas por letras minúsculas (a, b, c, etc.). Se um apêndice aparecer no seu artigo e contiver uma ou mais figuras, continue a numeração consecutiva do texto principal. Não numerar os números apêndice, "A1, A2, A3, etc." As figuras em apêndices on-line (Material Suplementar Eletrônico) devem, contudo, ser numeradas separadamente.

➤ **Legendas da figura**

Cada figura deve ter uma legenda concisa descrevendo com precisão o que a figura representa. Inclua as legendas no arquivo de texto do manuscrito, e não no arquivo de figuras.

As legendas das figuras começam com o termo **Fig.** Em negrito, seguido pelo número da figura, também em negrito.

Nenhuma pontuação deve ser incluída após o número, nem qualquer pontuação a ser colocada no final da legenda.

Identificar todos os elementos encontrados na figura na legenda da figura; E usar caixas, círculos, etc., como pontos de coordenadas em gráficos.

Identifique o material previamente publicado fornecendo a fonte original na forma de uma citação de referência no final da legenda da figura.

➤ **Figura Localização e Tamanho**

Os números devem ser apresentados separadamente do texto, se possível. Ao preparar suas figuras, tamanho figuras para caber na largura da coluna. Para a maioria dos diários, as figuras devem ter 39 mm, 84 mm, 129 mm ou 174 mm de largura e não mais de 234 mm. Para os livros e revistas de tamanho de livro, as figuras devem ter 80 mm ou 122 mm de largura e não superior a 198 mm.

➤ **Permissões**

Se você incluir figuras que já foram publicadas em outro lugar, você deve obter permissão do (s) proprietário (s) de direitos autorais para o formato impresso e on-line. Lembre-se de que alguns editores não concedem direitos eletrônicos gratuitamente e que a Springer não poderá reembolsar quaisquer custos que possam ter ocorrido para receber essas permissões. Nesses casos, devem ser utilizados materiais de outras fontes.

➤ **Acessibilidade**

Para que as pessoas de todas as capacidades e incapacidades tenham acesso ao conteúdo das suas figuras, certifique-se de que todas as figuras têm legendas descritivas (usuários cegos poderiam então usar um software de texto para voz ou um hardware de texto para Braille). Padrões são usados em vez de ou para além de cores para transmitir informações (colorblind usuários seriam capazes de distinguir os elementos visuais) Qualquer letra de figura tem uma taxa de contraste de pelo menos 4,5: 1.

➤ **Material complementar eletrônico**

Springer aceita arquivos multimídia eletrônicos (animações, filmes, áudio, etc.) e outros arquivos suplementares a serem publicados on-line juntamente com um artigo ou um capítulo de livro. Este recurso pode adicionar dimensão ao artigo do autor, pois certas informações não podem ser impressas ou são mais convenientes em forma eletrônica.

Antes de submeter os conjuntos de dados de pesquisa como material suplementar eletrônico, os autores devem ler a política de dados de pesquisa da revista. Encorajamos que os dados de pesquisa sejam arquivados em repositórios de dados sempre que possível.

➤ **Submissão**

Fornecer todo o material suplementar em formatos de arquivo padrão.

Inclua em cada arquivo as seguintes informações: título do artigo, nome do diário, nomes dos autores; Afiliação e endereço de e-mail do autor correspondente.

Para acomodar os downloads de usuários, tenha em mente que arquivos de maior tamanho podem exigir tempos de download muito longos e que alguns usuários podem ter outros problemas durante o download.

-Áudio, Vídeo e Animações:

Relação de aspecto: 16: 9 ou 4: 3;

Tamanho máximo do arquivo: 25 GB;

Duração mínima do vídeo: 1 seg;

Formatos de arquivo suportados: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxfl, mts, m4v, 3gp;

➤ Texto e Apresentações

Envie seu material em formato PDF; doc ou ppt não são adequados para a viabilidade em longo prazo. Uma coleção de figuras também pode ser combinada em um arquivo PDF.

➤ Planilhas

As planilhas devem ser convertidas para PDF se não houver interação com os dados. Se os leitores deveriam ser encorajados a fazer seus próprios cálculos, as planilhas devem ser enviadas como arquivos .xls (MS Excel).

➤ Formatos Especializados

Formato especializado, como .pdb (química), .wrl (VRML), .nb (notebook Mathematica) e .tex também podem ser fornecidos.

➤ Coletar vários arquivos

É possível coletar vários arquivos em um arquivo .zip ou .gz.

➤ Numeração

Ao fornecer qualquer material suplementar, o texto deve mencionar especificamente o material como uma citação, semelhante ao das figuras e tabelas. Consulte os arquivos suplementares como "Recurso Online", por exemplo, "... como mostrado na animação (Recurso Online 3)", "... dados adicionais são fornecidos no Recurso Online 4". Nomeie os arquivos consecutivamente, p. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

➤ Legendas

Para cada material suplementar, forneça uma legenda concisa descrevendo o conteúdo do arquivo.

➤ Processamento de ficheiros suplementares

Material eletrônico suplementar será publicado como recebido do autor sem qualquer conversão, edição ou reformatação.

➤ **Acessibilidade**

Para que as pessoas de todas as habilidades e incapacidades tenham acesso ao conteúdo de seus arquivos suplementares, certifique-se de que o manuscrito contém uma legenda descritiva para cada material suplementar.

Arquivos de vídeo não contêm nada que pisca mais de três vezes por segundo (para que os usuários propensos a convulsões causadas por tais efeitos não são colocados em risco).

➤ **Edição de idioma inglês**

Para editores e revisores avaliarem com precisão o trabalho apresentado em seu manuscrito você precisa garantir que o idioma Inglês é de qualidade suficiente para ser compreendido. Se você precisar de ajuda para escrever em inglês, você deve considerar: pedindo a um colega que é um falante nativo do inglês para revisar seu manuscrito para maior clareza, visitando o tutorial em inglês que cobre os erros comuns ao escrever em inglês, usando um serviço de edição de linguagem profissional, onde os editores irão melhorar o inglês para garantir que seu significado é claro e identificar problemas que exigem sua revisão. Dois desses serviços são fornecidos por nossos afiliados Nature Research, Editing Service e American Journal Experts.

➤ **Tutorial em inglês**

Serviço de Edição de Pesquisa de Natureza American Journal Experts

Observe que o uso de um serviço de edição de idioma não é um requisito para publicação nesta revista e não implica ou garante que o artigo será selecionado para revisão por pares ou aceito.

Se o seu manuscrito for aceito, será verificado por nossos editores para a ortografia e estilo formal antes da publicação.

➤ **Responsabilidades éticas dos autores**

Esta revista está empenhada em defender a integridade do registro científico. Como membro do Committee on Publication Ethics (COPE), a revista seguirá as diretrizes da COPE sobre como lidar com possíveis atos de má conduta. Os autores devem abster-se de deturpar os resultados da pesquisa, o que poderia prejudicar a confiança na revista, o profissionalismo da autoria científica e, em última instância, todo o esforço científico.

Manter a integridade da pesquisa e sua apresentação pode ser alcançado seguindo as regras da boa prática científica, que incluem:

O manuscrito não foi submetido a mais de uma revista para consideração simultânea.

O manuscrito não foi publicado anteriormente (em parte ou na íntegra), a menos que o novo trabalho se refira a uma expansão do trabalho anterior (favor fornecer transparência sobre a reutilização de material para evitar a sugestão de reciclagem de texto ("auto-plágio").

Um único estudo não é dividido em várias partes para aumentar a quantidade de submissões e submetido a várias revistas ou a uma revista ao longo do tempo (por exemplo, "publicação de salame").

Nenhum dado foi fabricado ou manipulado (incluindo imagens) para apoiar suas conclusões.

Nenhum dado, texto ou teorias de outros são apresentados como se fossem do próprio autor ("plágio"). Reconhecimentos apropriados a outros trabalhos devem ser dados (isto inclui o material que é copiado próxima (quase literal), resumido e / ou paraphrased), aspas são usadas para a cópia literal do material, e as permissões são protegidas para o material que é protegido por direitos de autor.

Nota importante: o periódico pode usar o software para detectar plágio.

O consentimento para apresentar foi recebido explicitamente de todos os co-autores, bem como das autoridades responsáveis - tácita ou explicitamente - no instituto/organização onde o trabalho foi realizado, antes da apresentação do trabalho.

Os autores cujos nomes aparecem na submissão contribuíram suficientemente para o trabalho científico e, portanto, compartilham responsabilidade coletiva e responsabilidade pelos resultados.

Os autores são fortemente aconselhados a assegurar o grupo de autores corretos, autor correspondente e ordem dos autores na submissão. As alterações de autor ou na ordem dos autores não são aceitas após a aceitação de um manuscrito.

A adição e / ou a exclusão de autores na fase de revisão pode justificadamente justificar-se. Uma carta deve acompanhar o manuscrito revisado para explicar o papel do (s) autor (es) adicionado (s) e / ou excluído (s). Documentação adicional pode ser necessária para apoiar o seu pedido.

Os pedidos de adição ou remoção de autores como resultado de litígios de autoria após a aceitação são honrados após a notificação formal pelo instituto ou órgão independente e/ou quando houver acordo entre todos os autores.

À pedido, os autores devem estar preparados para enviar documentação ou dados relevantes para verificar a validade dos resultados. Isso pode ser na forma de dados brutos, amostras, registros, etc. Informação sensível sob a forma de dados confidenciais proprietários é excluída.

Se houver suspeita de má conduta, a revista realizará uma investigação seguindo as diretrizes da COPE. Se, após a investigação, a alegação parecer suscitar preocupações válidas, o autor acusado será contactado e terá a oportunidade de abordar a questão. Se a má conduta tiver sido estabelecida além de qualquer dúvida razoável, isso pode resultar na implementação do Editor-Chefe das seguintes medidas, incluindo, mas não se limitando a:

Se o artigo ainda está em consideração, ele pode ser rejeitado e devolvido ao autor;

Se o artigo já foi publicado on-line, dependendo da natureza e gravidade da infração, uma errata será colocada com o artigo ou em casos graves retração completa do artigo irá ocorrer. A razão deve ser dada na errata publicada ou nota de retração. Observe que a retração significa que o papel é mantido na plataforma, com marca d'água "retraída" e uma explicação para a retração é fornecida em uma nota ligada ao artigo com marca d'água. A instituição do autor pode ser informada.

➤ Cumprimento das normas éticas

Para assegurar a objetividade e a transparência na pesquisa e assegurar que os princípios aceitos de conduta ética e profissional tenham sido seguidos, os autores devem incluir informações sobre fontes de financiamento, potenciais conflitos de interesses (financeiros ou não financeiros), consentimento informado. Participantes, e uma declaração sobre o bem-estar dos animais se a pesquisa envolveu animais.

Os autores devem incluir as seguintes declarações (se aplicável) em uma seção separada intitulada "Conformidade com os Padrões Éticos" ao enviar um artigo:

Divulgação de potenciais conflitos de interesses;

Pesquisa envolvendo participantes humanos e/ou animais;

➤ Consentimento informado

Observe que os padrões podem variar ligeiramente por revista, dependendo de suas políticas de revisão pelos pares (ou seja, revisão de pares simples ou duplo-cego), bem

como por disciplina de disciplina do periódico. Antes de submeter o seu artigo, verifique cuidadosamente as instruções que se seguem a esta secção.

O autor correspondente deve estar preparado para coletar documentação de conformidade com padrões éticos e enviar se solicitado, durante a revisão por pares ou após a publicação.

Aos editores se reservam o direito de rejeitar manuscritos que não cumpram as diretrizes acima mencionadas. O autor será responsabilizado por falsas declarações ou falhas no cumprimento das diretrizes acima mencionadas.

➤ Divulgação de potenciais conflitos de interesse

Os autores devem divulgar todos os relacionamentos ou interesses que possam ter influência direta ou potencial ou influenciar o trabalho. Embora um autor não sinta que há qualquer conflito, a divulgação de relacionamentos e interesses fornece um processo mais completo e transparente, levando a uma avaliação precisa e objetiva do trabalho. A percepção de conflitos de interesses reais ou percebidos é uma perspectiva a que os leitores têm direito. Isso não significa que uma relação financeira com uma organização que patrocinou a pesquisa ou compensação recebida por trabalho de consultoria é inadequada. Exemplos de potenciais conflitos de interesses que estão direta ou indiretamente relacionados com a investigação podem incluir, mas não estão limitados aos seguintes:

- Subsídios de pesquisa de agências de financiamento (por favor, informe o financiador de pesquisa e o número de concessão);
- Honorários por falar em simpósios;
- Apoio financeiro para participar de simpósios;
- Apoio financeiro para programas educacionais;
- Emprego ou consulta;
- Apoio de um patrocinador do projeto;
- Posição em conselho consultivo ou conselho de administração ou outro tipo de relações de gestão;
- Afiliações múltiplas;
- Relações financeiras, por exemplo, participação em ações ou juros de investimento;
- Direitos de propriedade intelectual (por exemplo, patentes, direitos autorais e royalties de tais direitos);
- Possas de cônjuge e / ou filhos que possam ter interesse financeiro no trabalho.

Além disso, os interesses que vão além dos interesses financeiros e compensação (interesses não financeiros) que podem ser importantes para os leitores devem ser divulgados. Estes podem incluir, mas não estão limitados a relacionamentos pessoais ou interesses concorrentes direta ou indiretamente vinculados a esta pesquisa, ou interesses profissionais ou crenças pessoais que podem influenciar a sua pesquisa.

O autor correspondente coleta as formas de divulgação de conflito de interesse de todos os autores. Nas colaborações de autores onde acordos formais de representação o permitem, basta que o autor correspondente assine o formulário de divulgação em nome de todos os autores. Exemplos de formulários podem ser encontrados

Aqui:

O autor correspondente incluirá uma declaração resumida no texto do manuscrito em uma seção separada antes da lista de referência, que reflete o que está registrado no potencial formulário de divulgação de conflito de interesses.

Veja abaixo exemplos de divulgações:

Financiamento: Este estudo foi financiado por X (concessão número X).

Conflito de interesse: O autor A recebeu subsídios de pesquisa da empresa A. O autor B recebeu um orador honorário da empresa X e possui ações na empresa Y. O autor C é membro do comitê Z.

Se não houver conflito, os autores devem declarar:

Conflito de Interesses: Os autores declaram não ter conflito de interesses.

➤ Após a aceitação:

Após a aceitação do seu artigo, você receberá um link para o aplicativo de consulta de autor especial na página da Springer na qual você pode assinar a declaração de transferência de direitos autorais on-line e indicar se você deseja pedir OpenChoice e offprints.

Uma vez que o pedido de consulta de autor tenha sido concluído, seu artigo será processado e você receberá as provas.

➤ Transferência de direitos autorais

Os autores serão solicitados a transferir os direitos autorais do artigo para o Editor (ou conceder à Editora direitos exclusivos de publicação e divulgação). Isso garantirá a mais ampla proteção possível e disseminação de informações sob leis de direitos autorais.

Licença Creative Commons Atribuição-Use Não-Comercial 4.0 Licença Internacional

➤ Offprints

As remessas podem ser encomendadas pelo autor correspondente.

➤ Ilustrações coloridas

A publicação de ilustrações coloridas é gratuita.

➤ Leitura de prova

A finalidade da prova é verificar se há erros de composição ou de conversão, bem como a integridade e precisão do texto, tabelas e figuras. Alterações substanciais no conteúdo, por exemplo, novos resultados, valores corrigidos, título e autoria, não são permitidas sem a aprovação do Editor.

Após a publicação on-line, outras alterações só podem ser feitas sob a forma de um Erratum, que será hiperlink para o artigo.

➤ Primeiro online

O artigo será publicado online após o recebimento das provas corrigidas. Esta é a primeira publicação oficial citável com o DOI. Após o lançamento da versão impressa, o papel também pode ser citado por número e números de página.

➤ Open choice

Além do processo normal de publicação (no qual um artigo é submetido à revista e o acesso a esse artigo é concedido a clientes que compraram uma assinatura), a Springer oferece uma opção alternativa de publicação: Springer Open Choice. Um artigo Springer Open Choice recebe todos os benefícios de um artigo baseado em assinatura regular, mas, além disso, é disponibilizado publicamente através da plataforma online SpringerLink da Springer.

➤ Escolha aberta

Direitos de autor e termo da licença - CC BY

Escolha aberta de artigos não exige a transferência de direitos autorais como o direito de autor permanece com o autor. Ao optar pelo acesso aberto, o (s) autor (es) concordam em publicar o artigo sob a Licença Creative Commons Attribution License.

Saiba mais sobre o contrato de licença.

Anexo II



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 8 de julho de 2015.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Determinação de Potencial Genotóxico e Mutagênico de Recursos Hídricos da Região da Grande Dourados", protocolo nº 10/2015, sob responsabilidade de Alexéia Barufatti Grisolia – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 02 de junho de 2015.

<i>Vigência do Projeto</i>	15/07/2015 – 30/04/2018
<i>Espécie/Inchagem</i>	<i>Astyanax</i> sp.
<i>Nº de animais</i>	340
<i>Peso/idade</i>	10 g
<i>Sexo</i>	Machos e Fêmeas
<i>Origem</i>	Animais de descarte de Pisciculturas da Região de Dourados – Piscicultura Douradense e Isca Viva

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA