

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

JULIANA CAROLINE VIVIAN SPOSITO

**Avaliação da qualidade de águas superficiais em
mananciais hídricos Sul-Mato-Grossenses**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

2018

JULIANA CAROLINE VIVIAN SPOSITO

**Avaliação da qualidade de águas superficiais em
mananciais hídricos Sul-Mato-Grossenses**

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

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia na área de concentração Ciência Ambiental.

DOURADOS/MS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S764a Sposito, Juliana Caroline Vivian
Avaliação da qualidade de águas superficiais em mananciais hídricos sul-mato-grossenses / Juliana Caroline Vivian Sposito. – Dourados, MS : Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.
93f.

Orientadora: Profa. Dra. Alexeia Baruffatti Grisolia.
Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) – Faculdade de Ciências Faculdade de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Solos – Uso e cobertura. 2. Contaminação do solo.
3. Águas superficiais – Qualidade – Avaliação. 4. Mato Grosso do Sul – Recursos hídricos – Avaliação. I. Título.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“Avaliação da qualidade de águas superficiais em mananciais hídricos sul-mato-grossenses”**, de autoria de **Juliana Caroline Vivian Sposito**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

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

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

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

Dr. Romulo Penna Scorza Junior
Membro Examinador (EMBRAPA)

Prof.^a Dr.^a Lucilene Finoto Viana
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 18 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho em especial:

À Deus, por ter me abençoado com sabedoria, saúde e disposição para a realização deste trabalho.

À UFGD (Universidade Federal da Grande Dourados) Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental por ter me proporcionado condições para o desenvolvimento desse trabalho e a todos os professores pelos conhecimentos adquiridos.

À FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) pelo suporte financeiro a pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, permitindo por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) realizar uma parte da minha pesquisa na cidade de Barcelona, Espanha.

A todos os professores que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial a minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Alexeia Barufatti Grisolia. Obrigada pela oportunidade em ser sua aluna desde a graduação até o doutorado. Obrigada também pela confiança, apoio e dedicação ao longo deste trabalho, além dos conhecimentos por mim adquiridos, frutos de sua orientação, que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao coorientador Dr. Benjamin Piña i Capo, pesquisador do “Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Spanish National Research Council” (CSIC), no “Institute of Environmental Assessment and Water Research” (IDAEA), e aos colegas de laboratório Laia, Marta, Ruben e Morgana, os quais compartilharam comigo seus conhecimentos.

A Prof^ª. Dr^ª. Cassiana Carolina Montagner Raimundo e aos seus alunos Cristiane Vidal, Raphael D'Anna Acayaba, os quais me auxiliaram nas análises de compostos emergentes.

Ao Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento e ao seu aluno Anderson Fernandes da Silva, responsáveis pelo auxílio nas análises das amostras de água para determinação de metais.

Ao Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez, por me auxiliar durante a seleção dos pontos de amostragem para a realização deste estudo.

Aos colegas Luiza Flávia Veiga Francisco, Jéssica Pereira, Bruno do Amaral Crispim, Marcia Jorge, Lucilene Finoto Viana e demais colegas de trabalho pelo carinho, auxílio em coletas, análises de lâminas, análises estatísticas e sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Salete e Amauri, e aos meus irmãos Junior e Jorge, a minha cunhada Natalia e minha sobrinha Isis. Obrigada pelo incentivo, apoio, carinho, força e amor incondicional que foram em grande parte responsáveis pela realização desse trabalho. Obrigado por estarem sempre presentes na minha vida!

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract	02
1. Introdução geral e relevância do tema	03
2. Hipótese	05
3. Objetivos	06
4. Revisão de literatura	07
4.1 Caracterização da área de estudo	07
4.2 Monitoramento ambiental	08
4.2.1 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade	09
4.2.2 Testes moleculares	11
4.2.3 Uso e cobertura do solo	12
4.2.4 Monitoramento químico	13
5. Referências	14

ARTIGO 1

Influência das características da paisagem em águas superficiais de rios sul-matogrossenses

Resumo

Abstract

1. Introdução	24
2. Material e métodos	25
2.1 Descrição da área de estudo	25
2.2 Amostragem	26
2.3 Uso e cobertura do solo	26
2.4 Determinação de Metais	26
2.5 Determinação de Contaminantes Emergentes (CEs)	27
3. Resultados	29
3.1 Caracterização do uso e cobertura do solo	29
3.2 Concentração de metais na água	29
3.3 Concentração de Contaminantes Emergentes (CEs)	30
4. Discussão	30
5. Conclusão	34
6. Referências	34

ARTIGO 2

Avaliação da influência do uso e cobertura do solo no potencial toxicogenético de águas superficiais da região centro-oeste do Brasil

Resumo

1. Introdução	39
2. Material e métodos	40
2.1 Área de estudo e amostragem	40
2.2 Mapa de uso e cobertura do solo	41
2.3 Determinação dos parâmetros físico-químicos nas amostras de água	42
2.4 Teste de <i>Allium cepa</i>	42
2.5 Testes com <i>Astyanax lacustris</i>	42
2.5.1 Teste de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN)	42
2.5.2 Ensaio do Cometa	42
2.6 Análise estatística	43
3. Resultados	43
3.1 Uso e cobertura do solo	43
3.2 Análises físico-químicas da água	44
3.3 Teste de <i>Allium cepa</i>	45
3.4 Teste com <i>Astyanax lacustris</i>	45
3.5 Período de coleta	46
3.6 Análise de correlação	46
4. Discussão	47
5. Conclusão	50
6. Referências	50

ARTIGO 3

Contaminantes emergentes em rios brasileiros: ocorrência e efeitos na expressão gênica em embriões de zebrafish (*Danio rerio*)

Resumo

Destaques

1. Introdução	56
2. Material e métodos	58
2.1 Área de estudo e amostragem	58

2.2 Determinação de Contaminantes Emergentes (CEs) na água	59
2.3 Químicos	60
2.3.1 Animais e condições de criação	60
2.3.2 Exposição para análise de expressão gênica	61
2.3.3 Extração de RNA	62
2.3.4 Análise de RT-qPCR	62
2.4 Análise dos dados	63
3. Resultados	63
3.1 Análises de Contaminantes Emergentes (CEs)	63
3.2 Análises moleculares	66
4. Discussão	68
4.1 Contaminantes Emergentes (CEs)	68
4.2 Análises moleculares	69
5. Conclusão	71
6. Referências	72
Informação suplementar	82
Considerações finais	85

1 **Resumo**

2 Os recursos hídricos sofrem influência das atividades antrópicas ao longo de toda
3 sua extensão. Essas atividades proporcionam a liberação de efluentes provenientes de
4 esgoto doméstico e atividades agroindustriais comprometendo a qualidade da água e
5 causando danos genéticos aos organismos expostos. Assim, o trabalho teve como
6 objetivo: determinar a presença de metais e contaminantes emergentes nos rios Dourados
7 e Brilhante, avaliar efeitos biológicos em organismos testes, bem como avaliar a
8 influência do uso e cobertura do solo na qualidade da água. Proporções de uso e cobertura
9 do solo foram mensuradas com auxílio do programa ArcGIS®. Metais foram
10 determinados por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente.
11 Contaminantes Emergentes (CEs) foram determinados utilizando extração em fase sólida
12 seguido de análise em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e
13 análises físico-químicas foram realizadas utilizando sonda multiparâmetro. Amostras de
14 água foram avaliadas utilizando os testes de *Allium cepa* e *Astyanax lacustris*. Efeitos de
15 misturas de CEs foram analisados de acordo com alterações na expressão de genes em
16 embriões de zebrafish. A análise de uso e cobertura do solo mostrou que as áreas no
17 entorno do pontos de amostragem são ocupadas predominantemente por atividade
18 agrícola. Dados físico-químicos como, oxigênio dissolvido e pH apresentaram valores
19 acima da legislação brasileira. Os resultados do teste de *A. cepa* sugerem que amostras de
20 água de ambos os rios exerceram efeitos citotóxicos e genotóxicos significativos,
21 especialmente para índice mitótico. Para o teste com *A. lacustris*, também verificou-se
22 efeito genotóxico, observado pela diferença significativa entre anormalidades nucleares,
23 quebras no DNA observados pelo Ensaio do Cometa. Além do mais, a análise de
24 correlação de Pearson revelou que os dados de uso e cobertura do solo e parâmetros físico-
25 químicos foram estatisticamente correlacionados com danos genéticos nos bioensaios
26 realizados. Para análise molecular, misturas de CEs induziram a expressão dos genes *cat*,
27 *cyp19a1b* e *cyp1a*. Neste contexto, os resultados indicam a influência do uso e cobertura
28 do solo na contaminação dos recursos hídricos por metais e CEs. Além do potencial das
29 amostras de água proveniente dos rios Dourados e Brilhante em causar efeitos biológicos
30 adversos nos organismos expostos.

31 **Palavras-chave:** Uso e cobertura do solo; metais; contaminantes emergentes; *Allium*
32 *cepa*; *Astyanax lacustris*; *Danio rerio*.

33

34

35 **Abstract**

36 Water resources are influenced by anthropogenic activities along their entire length.
37 These activities provide for the release of effluents from domestic sewage and agro-
38 industrial activities that compromise water quality and cause genetic damage to exposed
39 organisms. The objective of this study was to determine the presence of metals and
40 pollutants in the Dourados and Brilhante rivers, to evaluate biological effects in test
41 organisms, as well as to evaluate the influence of use and land cover on water quality.
42 Proportions of land use and cover were measured using the ArcGIS® program. Metals
43 were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Emerging
44 pollutants (ECs) were determined using solid-phase extraction followed by liquid
45 chromatography coupled to mass spectrometry and physical-chemical analyzes were
46 performed using multiparameter probe. Water samples were evaluated using the tests of
47 *Allium cepa* and *Astyanax lacustris*. Effects of mixtures of ECs were analyzed according
48 to changes in gene expression in zebrafish embryos. The analysis of land use and cover
49 showed that the areas around the sampling sites are predominantly occupied by
50 agricultural activity. Physical-chemical data such as dissolved oxygen and pH presented
51 values above Brazilian legislation. The results of the *A. cepa* suggest that water samples
52 from both rivers exerted significant cytotoxic and genotoxic effects, especially for mitotic
53 index. For the *A. lacustris* test, genotoxic effect was also observed, observed by the
54 significant difference between nuclear abnormalities, DNA breaks observed by the Comet
55 Assay. Moreover, Pearson's correlation analysis revealed that use and land cover data and
56 physico-chemical parameters were statistically correlated with genetic damage in the
57 bioassays performed. For molecular analysis, mixtures of ECs induced expression of the
58 *cat*, *cyp19a1b* and *cyp1a* genes. In this context, the results indicate the influence of soil
59 use and coverage on the contamination of water resources by metals and ECs. In addition
60 to the potential of water samples from the Dourados and Brilhante rivers to cause adverse
61 biological effects on exposed organisms.

62 **Keywords:** Use and land cover; metals; emerging contaminants; *Allium cepa*; *Astyanax*
63 *lacustris*; *Danio rerio*.

64

65

66

67

68

69 **1. Introdução geral e relevância do tema**

70 A qualidade da água é um dos requisitos fundamentais para a saúde humana e
71 qualidade de vida dos ecossistemas. No entanto, atividades antrópicas como o processo
72 de urbanização, industrialização e atividades agropecuárias vêm promovendo impactos
73 aos ambiente aquáticos (da Rocha et al., 2018).

74 A avaliação da relação de uso e cobertura do solo próximos aos recursos hídricos
75 e a qualidade da água constituem parâmetros importantes nos estudos de bacias
76 hidrográficas (Wan et al., 2014). O uso e cobertura do solo, quando não planejado, pode
77 alterar a qualidade da água em relação as características físico-químicas (Mori et al.,
78 2015), presença de compostos como metais pesados (Oliva et al., 2012) e emergentes
79 (Ferreira, 2005; Masiá et al., 2015), devido à proximidade de atividades antrópicas em
80 torno dos recursos hídricos ou escoamento superficial de contaminantes.

81 Atividades agrícolas desordenadas (por exemplo, manejo inadequado do solo e
82 intenso uso de defensivos agrícolas) alteram processos hidrológicos, reduzem a
83 capacidade de infiltração da água nos solos e aumentam as taxas de escoamento
84 superficial. Assim, práticas agrícolas inadequadas podem constituir um dos principais
85 fatores de degradação dos recursos hídricos (Muritiba, 2011).

86 Atividades agrícolas geram resíduos que podem impactar o ambiente e a qualidade
87 dos recursos hídricos. A atividade agrícola do Estado de Mato Grosso do Sul (MS) está
88 fortemente ligada à produção de culturas temporárias que ocupam lugar de destaque na
89 produção em nível nacional como milho (3º lugar), cana-de-açúcar (4º lugar) e soja (5º
90 lugar) (IBGE, 2016).

91 Neste contexto, os rios Dourados e Brilhante se caracterizam por apresentar
92 atividades econômicas por quase toda sua extensão, liberando efluentes provenientes de
93 esgoto doméstico, lixo urbano, descarte de resíduos industriais para rios e córregos
94 pertencentes a essas bacias comprometendo a qualidade da água, sendo necessário a
95 avaliação da qualidade desses recursos hídricos.

96 No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), por meio da
97 resolução nº 357/2005, estabelece parâmetros e limites aceitáveis, a fim de garantir a
98 qualidade dos ecossistemas aquáticos. Contudo, a avaliação dos parâmetros físico-
99 químicos não revela o efeito da contaminação ambiental sobre os organismos aquáticos,
100 assim, diversos estudos propondo a utilização de organismos testes, como ferramentas
101 complementares para avaliação das propriedades citotóxicas e genotóxicas da água de

102 rios têm se tornado de grande importância em estudos de avaliação de contaminação
103 aquática (Nunes et al., 2011; Bianchi et al., 2015).

104 O teste *Allium cepa* tem sido considerado excelente organismo-teste para
105 avaliação de danos genéticos de diferentes amostras ambientais, tais como águas
106 superficiais impactadas por atividades antrópicas (Bianchi et al., 2015). Por outro lado,
107 organismos aquáticos, como *Astyanax lacustris* e *Danio rerio* também podem ser
108 satisfatórios para este tipo de avaliação (Zhang et al., 2003; Trujillo-Jiménez et al., 2011).
109 Diante do exposto, a utilização de ensaios que avaliem o potencial da água em causar
110 efeitos biológicos adversos nos organismos expostos constituem ferramenta importantes
111 no auxílio do monitoramento da qualidade da água.

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136 **2. Hipótese**

137 Amostras de águas dos rios Dourados e Brilhante apresentam compostos químicos
138 que comprometem a qualidade desses recursos hídricos e induzem efeitos biológicos em
139 organismos expostos.

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170 **3. Objetivos**

171 **Objetivo geral**

172 Determinar a presença de metais e contaminantes emergentes nos rios Dourados
173 e Brilhante, avaliar efeitos biológicos em organismos testes expostos as amostras de água,
174 bem como avaliar a influência do uso e cobertura do solo na qualidade da água.

175

176 **Objetivos específicos**

177 **Artigo 1**

- 178 • Avaliar a composição química da água (metais e contaminantes emergentes);
- 179 • Mapear os tipos de uso e cobertura do solo (%) próximas aos pontos amostrais;
- 180 • Investigar a influência das características da paisagem na qualidade da água dos
- 181 rios Dourados e Brilhante.

182

183 **Artigo 2**

- 184 • Determinar parâmetros físico-químicos (condutividade elétrica, pH, oxigênio
- 185 dissolvido e temperatura) da água e verificar se os mesmos estão em acordo com
- 186 limites aceitáveis estabelecidos pela Resolução do Conselho Nacional de
- 187 Conselho (CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005 – Classe 2).
- 188 • Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico de amostras de água superficiais dos
- 189 rios Dourados e Brilhante em *Allium cepa* e *Astyanax lacustris*;
- 190 • Avaliar a influência do uso e cobertura do solo nos danos genéticos e parâmetros
- 191 físico-químicos.

192

193 **Artigo 3**

- 194 • Determinar a ocorrência de Contaminantes Emergentes (CEs) em amostras de
- 195 água superficial dos rios Dourados e Brilhante;
- 196 • Reconstituir água com misturas de CEs;
- 197 • Avaliar os efeitos das misturas de CEs, em concentrações previamente
- 198 determinados nos rios e ambientalmente relevantes, na expressão gênica de
- 199 embriões de zebrafish.

200

201

202

203 **4. Revisão de literatura**

204 Os recursos hídricos estão entre os ecossistemas mais afetados por serem alvo de
205 diversos tipos de fontes poluidoras, tais como resíduos agropecuários, industriais,
206 domésticos, entre outros, gerando grande preocupação em escala mundial. No Brasil,
207 agências reguladoras foram criadas para monitorar e estabelecer normas a fim de
208 preservar os recursos hídricos. A Agência Nacional de Águas (ANA), criada no ano de
209 2000 e vinculada ao Ministério do Meio Ambiente, é responsável por assegurar a atual e
210 às futuras gerações, a disponibilidade de recursos hídricos com padrões de qualidade de
211 água adequados aos seus respectivos usos (ANA, 2013).

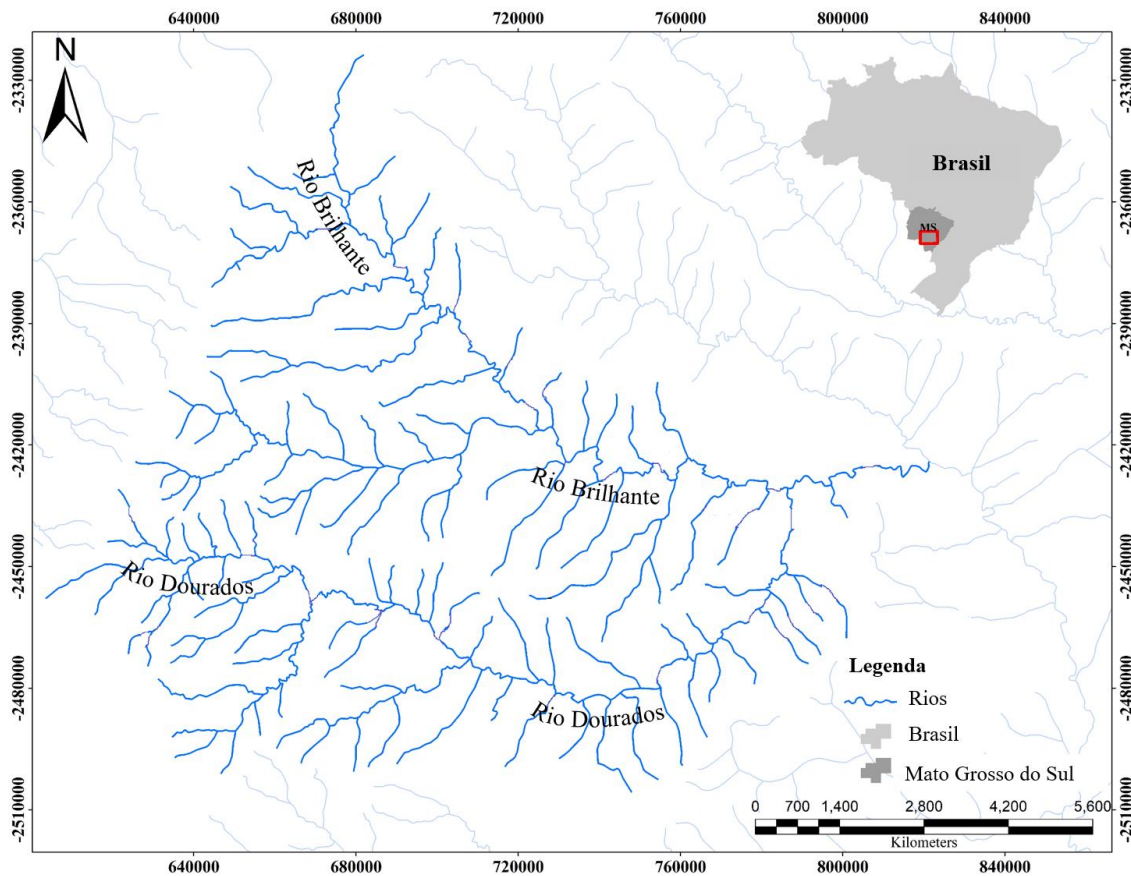
212 No Estado de Mato Grosso do Sul, o Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso
213 do Sul (IMASUL) é responsável pelo monitoramento da qualidade da água de rios e
214 córregos. O IMASUL controla a qualidade dos recursos hídricos por meio do Programa
215 de Monitoramento da Qualidade das Águas de Mato Grosso do Sul, e fornece subsídios
216 ao controle da poluição das águas, por meio de parâmetros físicos, químicos, biológicos,
217 que contribuem para o uso adequado dos recursos hídricos do Estado (IMASUL, 2016).

218 **4.1 Caracterização de rios Sul-Mato-Grossenses**

219 As bacias dos rios Dourados e Brilhante localizam-se ao sul do Estado de Mato
220 Grosso do Sul (Figura 1), na sub-bacia do rio Ivinhema que, por sua vez, se insere na
221 Bacia Hidrográfica do Alto do rio Paraná (Message et al., 2016). O rio Dourados nasce
222 na cidade de Antônio João, possui uma extensão de 370 km e ocupa cerca de 20,47 % da
223 área da sub-bacia do rio Ivinhema e aproximadamente 5,41% da área da Bacia do Rio
224 Paraná. O rio é considerado de suma importância para o Estado no suprimento de água
225 para abastecimento público de doze municípios entre eles: Antônio João, Ponta Porã,
226 Laguna Carapã, Caarapó, Vicentina, Jateí, Glória de Dourados, Ivinhema, Deodópolis,
227 Fátima do Sul, Itaporã e a cidade de Dourados, considerada a segunda maior cidade do
228 Estado, com mais de 218 mil habitantes (Mato Grosso do Sul, 2000; Ferreira e Silva,
229 2015; IBGE, 2017).

230 O rio Brilhante nasce na cidade de Sidrolândia, possui uma extensão de 344 Km
231 e ocupa uma área correspondente a 27,2% da área total da Bacia do rio Ivinhema. O rio
232 funciona como importante fonte de abastecimento hídrico e desenvolvimento de
233 atividades econômicas para nove municípios inseridos total ou parcialmente em seus
234 limites tais como: Angélica, Deodópolis, Douradina, Dourados, Itaporã, Maracaju, Ponta
235

236 Porã, rio Brilhante e Sidrolândia. O rio corre no sentido oeste e se uni aos rios Vacaria e
237 Dourados ao leste formando o rio Ivinhema (EMBRAPA, 2005; Ferreira e Silva, 2015).
238



239
240 **Figura 1:** Rios Dourados e Brilhante, Mato Grosso do Su, Brasil.

241

242 4.2 Monitoramento ambiental

243 Os recursos hídricos correspondem ao destino final de muitos efluentes, servindo
244 de veículo para exposição de organismos aquáticos à poluentes como metais e
245 contaminantes emergentes comprometendo a qualidade da água (Yi, Yang e Zhang, 2011;
246 Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho, 2017). Desta forma, a utilização de organismos vivos
247 conhecidos, como modelo experimental na detecção de impactos de contaminantes sobre
248 os mesmos, denominado biomonitoramento, torna-se uma opção viável para avaliação da
249 qualidade dos recursos hídricos por meio de bioensaios.

250 Os bioensaios, por sua vez, correspondem à utilização de métodos adequados para
251 identificação de efeitos adversos ocasionados por contaminantes ambientais nos
252 organismos testes. Bioensaios realizados com animais e plantas, separadamente ou em
253 combinação, são utilizados para avaliar a qualidade da água (Zegura et al., 2009). Dentre

254 os testes utilizados para estudos de avaliação ambiental destacam-se teste com *Allium*
255 *cepa*, e testes písceos em *Astyanax lacustris* e *Danio rerio*.

256

257 **4.2.1 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade**

258 Atualmente, torna-se cada vez mais imprescindível a realização de pesquisas
259 científicas com o objetivo de avaliar possíveis ameaças dos recursos hídricos aos
260 organismos expostos considerando as diversas fontes de contaminação destes recursos.
261 Sendo assim, se faz necessário a utilização de novas ferramentas como avaliação da
262 citotoxicidade ou genotoxicidade de águas superficiais.

263 Atividade citotóxica pode ser avaliada por meio da inibição do ciclo celular em
264 vegetais, caracterizando atividade antiproliferativa ou pelo aumento na divisão celular
265 (prófase, metáfase, anáfase e telófase), induzindo o aparecimento de tumores nos seres
266 vivos (Pires et al., 2001). Por outro lado, a atividade genotóxica avalia alterações na
267 estrutura do DNA, devido a presença de agentes clastogênicos, que promovem a quebra
268 de cromossomos e/ou aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação
269 cromossômica anormal, ocasionando a formação de micronúcleos e/ou alterações
270 cromossômicas (Silva, Erdtmann e Henriques, 2003; Leme e Marin-Morales, 2009;
271 Freitas et al., 2016). Alterações genéticas podem ser observadas em organismos
272 bioindicadores vegetais como *Allium cepa* (Figura 2) e animais como *Astyanax lacustris*
273 (Figura 3), ambos amplamente utilizados para avaliação de amostras ambientais.

274 O teste de *A. cepa* é sido considerado excelente para avaliação do potencial
275 citotóxico e genotóxico de diferentes amostras ambientais, tais como águas superficiais
276 impactadas por atividades antrópicas (Bianchi et al., 2015), águas residuais (efluentes) e
277 tratadas (Hemachandra e Pathiratne, 2017).

278 Bioensaios com plantas superiores como a *Allium cepa*, têm sido amplamente
279 utilizados devido suas vantagens como baixo custo; boa correlação com outros testes e
280 alta sensibilidade. Adicionalmente, os cromossomos de plantas superiores são grandes,
281 com número reduzido ($2n = 16$), de fácil visualização, permitindo análises de alterações
282 cromossômicas (Figura 2) e constituindo ferramenta eficiente em estudos de
283 monitoramento ambiental (Fiskesjö, 1985; Rank e Nielsen, 1997).

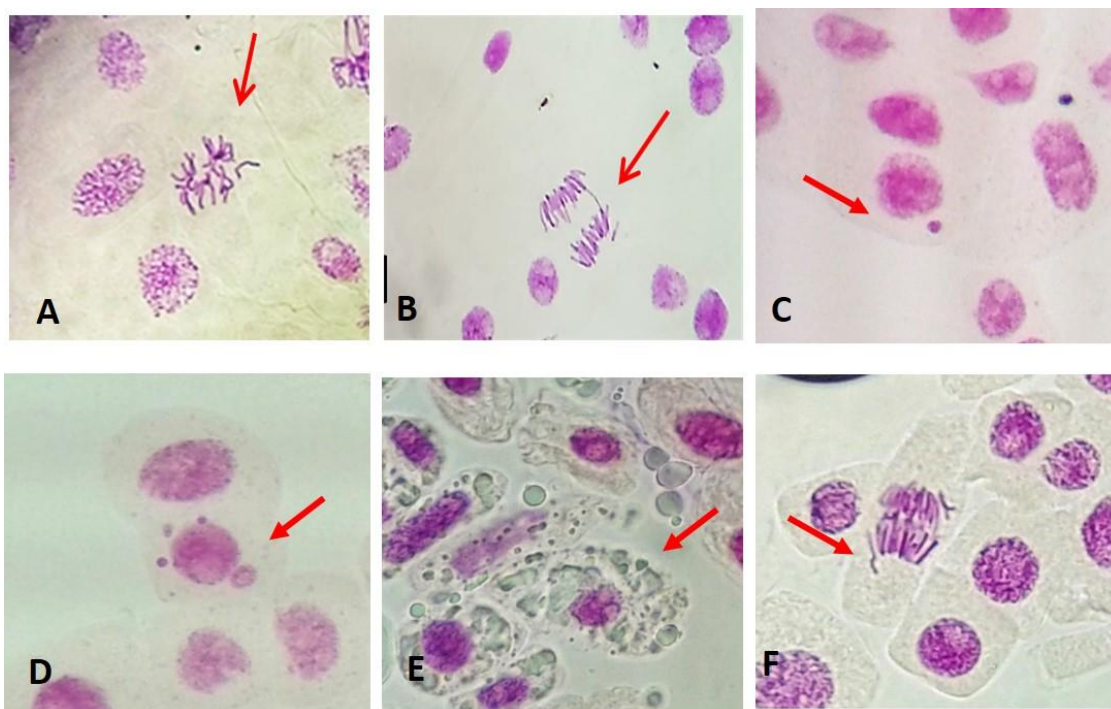
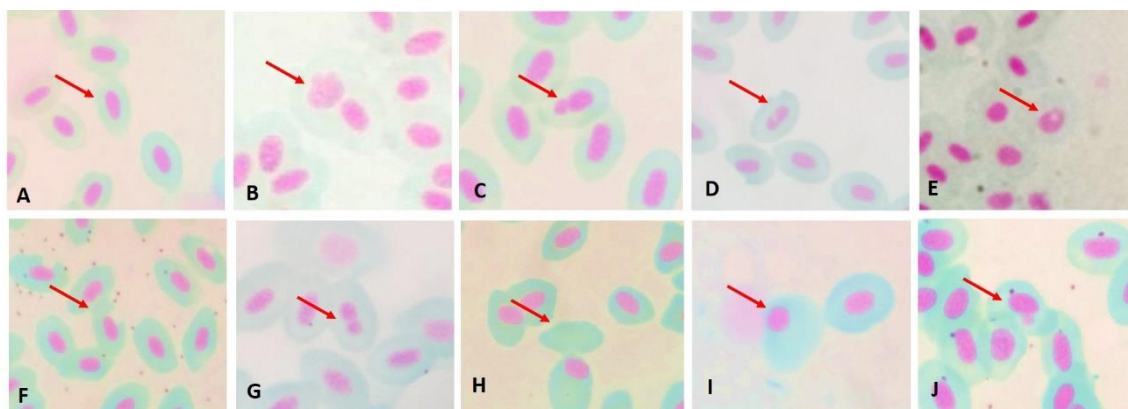


Figura 2: Células de *Allium cepa*. **A)** C-metáfase, **B)** Anáfase com Ponte Cromossômica, **C)** Interfase com Micronúcleo, **D)** Interfase com Brotamento nuclear, **E)** Morte Celular, **F)** Anáfase com perda cromossômica.

Além dos vegetais, os peixes também são frequentemente utilizados como organismos testes por bioacumularem substâncias tóxicas e serem sensíveis a compostos de origem antrópica. O peixe de água doce *Astyanax lacustris* (Lutken, 1875), popularmente conhecido como “lambari-do-rabo-amarelo”, tem sido utilizado em estudos de monitoramento ambiental para a determinação de locais impactados por diferentes contaminantes (Trujillo-Jiménez et al., 2011; Yamamoto et al., 2016). Os danos genéticos como formação de micronúcleos e alterações nucleares, bem como a fragmentação do DNA (Ensaio do Cometa) podem ser utilizados para avaliação da qualidade da água de águas superficiais (Barros et al., 2017).

O teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares (Figura 3) é um método baseado na contagem de alterações genéticas ocasionados por agentes químicos, físicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam promover a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) ocasionando a formação de danos genéticos (Silva et al., 2011). O teste MN, tem sido utilizado para monitorar potencial mutagênico da qualidade da água (Nunes et al., 2011).



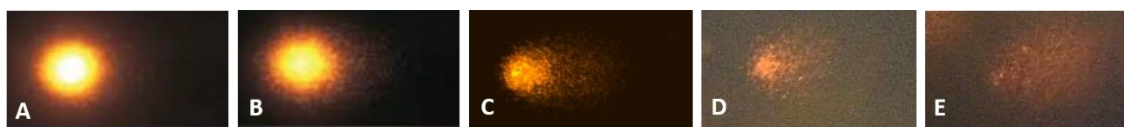
305

306 **Figura 3:** Células de *Astyanax lacustris*. **A)** Célula sem dano, **B)** Núcleo lobulado, **C)** Blebbed nuclei, **D)**
 307 Notched nuclei, **E)** Núcleo vacuolizado, **F)** Citoplasma vacuolizado, **G)** Célula binucleada, **H)** Célula sem
 308 núcleo, **I)** Picnose e **J)** Micronúcleo.

309

310 A detecção da atividade genotóxica em águas superficiais pode ser analisada
 311 por meio do Ensaio do Cometa. O referido ensaio está relacionado com a extensão do
 312 DNA que migra para fora do núcleo (Fairbairn et al., 1995). A medida mais utilizada na
 313 avaliação do dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das caudas
 314 formadas pela migração do DNA (Figura 4).

315



316

317 **Figura 4:** Ensaio do Cometa em células de *Astyanax lacustris*. **A)** Classe 0 (material genético sem dano),
 318 **B)** Classe 1 (dano leve), **C)** Classe 2 (dano moderado), **D)** Classe 3 (dano severo) e **E)** Classe 4 (dano
 319 máximo, DNA totalmente fragmentado).

320

321 4.2.2 Testes moleculares

322 *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae), conhecido como “peixe-zebra ou
 323 paulistinha”, foi descrito por Francis Hamilton em 1822. Este pequeno teleosteo de água
 324 doce é naturalmente originário do nordeste da Índia e corresponde ao vertebrado com
 325 maior número de genes codificadores de proteínas sequenciados (Liu e Leach, 2011).
 326 Outras inúmeras vantagens tem caracterizado este peixe como bom organismo indicador
 327 como, por exemplo, tamanho do indivíduo adulto entre 3-5 cm, crescimento rápido,
 328 maturidade em torno de três meses, baixo custo de manutenção, grande quantidade de
 329 ovos por dia (50-200 ovos), desenvolvimento extra uterino, ciclo reprodutivo curto e
 330 embriões transparentes (Feitsma e Cuppen, 2008).

331 Atualmente, este peixe é um modelo experimental consolidado e tem sido
332 amplamente adotado em diversas áreas da ciência, tais como: desenvolvimento (Dishaw
333 et al., 2014), teratologia (Adeyemi et al., 2015), comportamento (Abdallah, Thomas e
334 Jonz, 2015), toxicologia (Dai et al., 2014) e genética (Guo et al., 2017).

335 Alguns trabalhos têm relacionado diferentes níveis de expressão gênica em
336 organismos expostos a poluentes ambientais, dentre eles os contaminantes emergentes. O
337 peixe, como muitos outros vertebrados, reduzem danos causados pelo estresse oxidativo
338 usando um sistema de defesa com moléculas antioxidantes (Alvarez et al., 2005) ou por
339 enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) (Valavanidis et al., 2006). A transcrição de
340 catalase mostra uma fraca correlação positiva com dois herbicidas, hexazinona e atrazina,
341 (Van Der Kraak et al., 2014).

342 Além do mais, genes como o *cyp19alb* (aromatase B), gene específico do
343 cérebro, é um marcador bem conhecido para a exposição ao estrogênio considerando que
344 sua expressão é aumentada em amostras tratadas com Bisfenol A (BPA) (Chen et al.,
345 2017). Além do BPA, estrogênios como estriol também consideram o gene *cyp19alb* um
346 biomarcador notável da exposição xenoestrogênio (Kah, 2013). A indução do gene *cyp1a*
347 também pode ser usado como biomarcador para a exposição de peixes a uma variedade
348 de compostos orgânicos como BPA, cafeína e diuron (Saeed et al., 2016; Aguirre-
349 Martínez et al., 2017; Velki et al., 2017).

350

351 **4.2.3 Uso e cobertura do solo**

352 A variação dos parâmetros de uso e cobertura do solo têm efeitos importantes na
353 qualidade da água dos recursos hídricos e, portanto, é considerada uma ferramenta
354 potencialmente informativa para análises da integridade dos ecossistemas aquáticos (Bua
355 et al., 2014).

356 Diferentes tipos de uso e cobertura do solo devem manter um equilíbrio entre
357 atividades antrópicas, como produção agropecuária, urbanização e bem estar dos
358 ecossistemas aquáticos considerando que essas atividades têm consequências ambientais
359 como alteração da qualidade dos recursos hídricos (DeFries et al., 2004; da Rocha et al.,
360 2018).

361 A avaliação da relação de uso da terra e qualidade da água superficial é uma
362 questão importante nos estudos de gestão de bacias hidrográficas (Wan et al., 2014),
363 considerando que este fator também está associado a alterações nas características físico-

364 químicas da água (Mori et al., 2015) e presença de compostos como metais (Oliva et al.,
365 2012) e contaminantes emergentes (Ferreira, 2005; Masiá et al., 2015).

366

367 **4.2.4 Monitoramento Químico**

368 Os metais nem sempre apresentam riscos para os ecossistemas, visto que em
369 baixas concentrações participam de muitos processos fisiológicos, sendo denominados de
370 elementos essenciais, contudo, em altas concentrações podem ocasionar danos genéticos
371 nos organismos expostos.

372 Altas concentrações de metais nos recursos hídricos têm sido associadas a
373 atividades antrópicas como descarga de resíduos domésticos, agrícolas e industriais não
374 tratados nos corpos d'água (Khadse et al., 2008; Venugopal et al., 2009). Os metais podem
375 ser absorvidos pelos organismos por meio de estruturas respiratórias e superfícies do
376 corpo (Costa et al., 2008).

377 Nagy et al. (2013) sugerem que a presença de metais induz rupturas de DNA que
378 podem ser reparadas, no entanto, algumas exposições podem representar lesões contínuas
379 e danificar o DNA de forma irreversível. Beyersmann e Hartwig (2008) observaram que
380 considerando propriedades físico-químicas dos metais, a genotoxicidade pode ser causada
381 por três mecanismos predominantes: (1) indução de estresse oxidativo, causando danos
382 ao DNA ou estimulando o crescimento celular; (2) inibição dos sistemas de reparo do
383 DNA, resultando em instabilidade genômica e acumulação de mutações; e (3)
384 irregularidades na proliferação celular por indução de percursos de sinalização ou
385 inativação de controles de crescimento.

386 Além dos metais, a presença de contaminantes emergentes também têm sido alvo
387 de preocupação da comunidade científica, devido sua persistência, atividade biológica,
388 além de não serem incluídos em monitoramentos de rotina. Definidos como compostos
389 de diferentes origens e natureza química, tais como natural ou antrópica, incluindo fontes
390 uBRanas e agroindustriais, os contaminantes emergentes (CEs) incluem compostos de
391 origem hospitalar (Thiele-Bruhn, 2003), farmacêutica (urbanos, estoque), higiene pessoal
392 (Heberer, 2002), defensivos agrícolas (Masiá et al., 2015), subprodutos de desinfecção
393 (urbanos, industriais) e produtos químicos industriais (indústria).

394 No Brasil, segundo Agência Nacional das Águas (ANA) CEs correspondem a
395 “subprodutos industriais, agrícolas, disruptores endócrinos, produtos farmacêuticos e de
396 cuidados pessoais, que podem não ser removidos durante os processos mais comuns de
397 tratamento de efluentes e que acabam contaminando sistemas de água doce. Esses

398 contaminantes podem prejudicar o sucesso reprodutivo de organismos vivos e causar
399 outros impactos ainda não detectados” (ANA, 2013).

400 Considerando que os CEs não são facilmente eliminados da água pelo processo
401 de tratamento de águas residuais, estes contaminantes têm gerado grande preocupação
402 sobre os possíveis efeitos que podem vir a causar nos organismos expostos (Bolong et al.,
403 2009). Desta forma, tais contaminantes são candidatos a futura regulamentação após
404 estudos de ecotoxicidade, efeitos à saúde humana, potencial de bioacumulação, transporte
405 e destino nos diferentes compartimentos ambientais (Montagner, Vidal e Acayaba, 2017).

406 O Brasil apresenta uma ampla área territorial onde se observam cenários que
407 agravam a situação em relação a apresentação de CEs nos recursos hídricos como falta de
408 saneamento básico em diversas regiões do país, consumo excessivo de defensivos
409 agrícolas devido a extensa área cultivada e importação ilegal destes produtos para o
410 Brasil. Pesquisas têm apontado para a existência de rotas que ligam regiões limítrofes do
411 Brasil, como a região Sul-Mato-Grossense, a países como o Paraguai para a importação
412 de defensivos agrícolas que se fará burlando as barreiras sanitárias e fiscais estabelecidas
413 por órgãos como a Receita Federal do Brasil e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
414 Desta forma, mesmo constituindo crime ambiental e contrabando, os ganhos econômicos
415 com a compra de defensivos agrícolas no Paraguai têm sido atrativa pelo grande
416 diferencial de preços, levando muitos agricultores a usar produtos ilegais (Dorfman et al.,
417 2014). Com isso, é de se esperar que as características regionais de cada Estado, tipo de
418 uso e cobertura do solo e economia, interfiram no tipo e concentração de CEs dependendo
419 da atividade antrópica realizada e padrão de consumo de cada região (Montagner, Vidal
420 e Acayaba, 2017).

421 Diante do exposto, torna-se relevante a realização de pesquisas que (1) avaliem a
422 influência do uso e cobertura do solo na qualidade da água; (2) determinem a presença de
423 contaminantes emergentes e metais; (3) determinem condições físico-químicas em
424 amostras de água e (4) avaliem o potencial da água em causar efeitos biológicos adversos
425 nos organismos expostos por meio da utilização de boensaios.

426

427 5. Referências

428 ABDALLAH, S. J.; THOMAS, B .S.; JONZ, M. G. Aquatic surface respiration and
429 swimming behaviour in adult and developing zebrafish exposed to hypoxia. **Journal of**
430 **Experimental Biology**, v. 218, n. 11, p. 1777-1786, May 2015.

431

432

433 ADEYEMI, J. A.; MARTINS-JUNIOR, A. C.; BABROSA JUNIOR, F. Teratogenicity,
434 genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to
435 arsenic and atrazine. **Comp Biochem Physiol C Toxicology & Pharmacology**, v. 172–
436 173, n. 12, p. 7-12, April 2015.
437
438
439 AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V.; REINADRY, H. C.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; HENRY,
440 T. B. Response of gene expression in zebrafish exposed to pharmaceutical mixtures:
441 Implications for environmental risk. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142,
442 n. 28, p. 471 – 479, April 2017.
443
444
445 ALVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and
446 abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1-2, p. 75 – 88, Feb.
447 2005.
448
449
450 ANA - Agência Nacional das Águas. **Guia Nacional de Coleta e Preservação de**
451 **Amostras**. Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos, 2011.
452 Disponível em:
453 <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>. Acessado em 24 de Maio de 2018
454
455
456
457 ANA - Agência Nacional das Águas. **Cuidando das Águas - Soluções para melhorar a**
458 **qualidade dos recursos hídricos**, 2013. Disponível em:
459 <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2013/CuidandoDasAguas-Solucao2aEd.pdf>. Acessado em 22 de Novembro de 2017
460
461
462
463 BARROS, I. T; CECCON, J. P.; GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; GRÖTZNER, S. R.;
464 RANDI, M. A. F.; BENEDITO, E.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; NETO, F. F.;
465 RIBEIRO, C. A DE O. Environmental risk assessment in five rivers of Parana River
466 basin, Southern Brazil, through biomarkers in *Astyanax* spp. **Environmental Science**
467 **and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16228–16240, May 2017.
468
469
470 BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into
471 molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493-512, May
472 2008.
473
474
475 BIANCHI, E.; GOLDONI, A.; TRINTINAGLIA, L.; LESSING, G.; SILVA, C. E. M.;
476 NASCIMENTO, C. A.; ZIULKOSKI, A. L.; SPILKI, F. R.; SILVA, L. B. Evaluation of
477 genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern
478 Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 68-74, May 2015.
479
480

481 BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects
482 of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v.
483 239, n. 1-3, p. 229-246, April 2009.
484
485
486 BUA, H.; MENG, W.; ZHANG, Y.; WAN, J. Relationships between land use patterns
487 and water quality in the Taizi River basin, China. **Ecological Indicators**, v. 41, p. 187–
488 197, June 2014.
489
490
491 CHEN, J.; SAILI, K. S.; LIU, Y.; LI, L.; ZHAO, Y.; JIA, Y.; BAI, C.; TANGUAY, R.
492 L.; DONG, Q.; HUANG, C. Developmental bisphenol A exposure impairs sperm
493 function and reproduction in zebrafish. **Chemosphere**, v. 169, p. 262 - 270, Feb. 2017.
494
495
496 CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº357. Diário Oficial**
497 **da União de 17 de Março de 2005.** Disponível em:
498 <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acessado em 20 de
499 Novembro de 2017.
500
501
502 COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em
503 ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.
504 1820-1830, Set. 2008.
505
506
507 da ROCHA, M. P.; DOURADO, P. L. R.; CADROSO, C. A. L.; CÂNDIDO, L. S.;
508 PEREIRA, J. G.; de OLIVEIRA, K. M. P.; GRISOLIA, A. B. Tools for monitoring
509 aquatic environments to identify anthropic effects. **Environmental Monitoring and**
510 **Assessment**, v. 190, p. 61, Jan. 2018.
511
512
513 DAI, Y. J.; JIA, Y. F.; CHEN, N.; BIAN, W. P.; LI, Q. K.; MA, Y. B.; CHEN, Y. L.;
514 PEI, D. S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology**
515 **and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11–17, Jan. 2014.
516
517
518 DEFRIES, R. S.; FOLEY, J. A.; ASNER, G. P. Land use choices: balancing human needs
519 and ecosystem function. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, p. 249 – 257,
520 June 2004.
521
522
523 DISHAW, L. V.; HUNTER, D. L.; PADNOS, B.; PADILLA, S.; STAPLETON, H. M.
524 Developmental Exposure to Organophosphate Flame Retardants Elicits Overt Toxicity
525 and Alters Behavior in Early Life Stage Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicological Sciences**,
526 v. 142, n. 2, p. 445–454, Sep. 2014.
527
528

529 DORFMAN, A.; FRANÇA, A. B. C.; SOARES, G. O. Marcos legais e redes de
530 contrabando de agrotóxicos: análise escalar a partir da fronteira Brasil-Uruguai.
531 **Terr@Plural**, v. 8, n. 1, p. 37-53, Jan./Jun. 2014.
532
533
534 EMBRAPA - Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Precipitação esperada na**
535 **Bacia do rio Brilhante, MS.** 2005. Disponível em:
536 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41443/1/DOC-752005.pdf>.
537 Acessado em 24 de Novembro de 2017.
538
539
540 FAIBRAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive
541 review. **Mutation Research**, v. 339, n. 1, p. 37–59, Feb. 1995
542
543
544 FEITSMA, H.; CUPPEN, E. Zebrafish as a cancer model. **Molecular Cancer Research**,
545 v. 6, n. 9-10, p. 685–694, Sept./Oct. 2008.
546
547
548 FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic
549 ecosystems. **Caderno de Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1884-1892, Nov./Dec. 2005.
550
551
552 FERREIRA, P. S., SILVA, C. A. **Caracterização do uso das terras da bacia**
553 **hidrográfica do Rio Brilhante – MS, a expansão da cana-de-açúcar (2005).**
554 Disponível em: <http://www.enanpege.ggf.br/2015/anais/arquivos/19/538.pdf>. Acessado
555 em: 26 de Abril de 2018.
556
557
558 FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standaDR in environmental monitoring. **Hereditas**,
559 v. 102, n. 1, p. 99–112, March 1985.
560
561
562 FREITAS, A. S.; CUNHA, I. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of
563 SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and
564 phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental**
565 **Safety**, v. 124, p. 426–434, Feb. 2016.
566
567
568 GONÇALVES, E.S., RODRIGUES, S.V., SILVA-FILHO, E.V. The use of caffeine as a
569 chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and
570 spatial variations in Teresópolis, Brazil. **Revista Ambiente e Água**, v. 12, n. 2, p. 192-
571 202, Dec. 2017.
572
573
574 GUO, D.; WANG, Y.; QIAN, Y.; CHEN, C.; JIAO, B.; CAI, L.; WANG, Q. Joint acute
575 and endocrine disruptive toxicities of malathion, cypermethrin and prochloraz to embryo-
576 larval zebrafish, *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 166, p. 63-71, Sept. 2017.
577
578

579 HEBERER, T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic
580 environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 1-2, p. 5–
581 17, May 2002.
582
583
584 HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Cytogenotoxicity screening of source
585 water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo
586 test systems: *Allium cepa* root based and Nile tilapia erythrocyte based tests. **Water**
587 **Research**, v. 108, n. 1, p. 320-329, Nov. 2017.
588
589
590 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola - Lavoura**
591 **Temporária**, 2016. Disponível em:
592 <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/pesquisa/14/10193?tipo=ranking&indicador=1024>
593 6. Acessado em 21 de Novembro de 2017.
594
595
596 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico**. 2017.
597 Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/dourados/panorama>. Acessado em
598 07/11/2017.
599
600
601 IMASUL - Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul. **Relatório de qualidade**
602 **das águas superficiais do Estado de Mato Grosso do Sul – 2014/2015**. 2016.
603 Disponível em: [http://www.imasul.ms.gov.br/wp-](http://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/74/2015/06/Qualidade_%C3%81guas_Superficiais_MS_2014_2015.pdf)
604 [content/uploads/sites/74/2015/06/Qualidade_%C3%81guas_Superficiais_MS_2014_20](http://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/74/2015/06/Qualidade_%C3%81guas_Superficiais_MS_2014_2015.pdf)
605 [15.pdf](http://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/74/2015/06/Qualidade_%C3%81guas_Superficiais_MS_2014_2015.pdf). Acessado em 22 de Novembro de 2017.
606
607
608 KAH, O. Brain aromatase and endocrine disruptors in zebrafish: from basic to applied
609 research. **Endocrine Abstracts**, v. 32:S9, 2013.
610
611
612 KHADSE, G. K.; PATNI, P. M.; KELKAR, P. S.; DEVOTTA, S. Qualitative evaluation
613 of Kanhan river and its tributaries flowing over central Indian plateau. **Environmental**
614 **Monitoring and Assessment**, v. 147, n. 1-3, p. 83–92, Dec. 2008.
615
616
617 LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental
618 monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81,
619 Jul./Aug. 2009.
620
621
622 LIU, S.; LEACH, S. D. Zebrafish Models for Cancer. **Annual Review of Pathology**, v.
623 6, p. 71-93, Feb. 2011.
624
625
626 MASIÁ, A.; CAMPO, J.; NAVARRO-ORTEGA, A.; BARCELÓ, D.; PICÓ, Y.
627 Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison

628 with historical data. **Science of The Total Environment**, v. 503–504, n. 15, p. 58-68,
629 Jul. 2015.

630
631

632 MATO GROSSO DO SUL. **Microbacia Hidrográfica do Rio Dourados: diagnóstico**
633 **e implantação da rede básica de monitoramento da qualidade das águas.** 2000.
634 Campo Grande: Secretaria de Estado de Meio Ambiente.

635
636

637 MESSAGE, H.J.; SANTOS, D.A.; BAUMGARTNER, M.T.; AFFONSO, I.P. Planícies
638 de inundação a Biodiversidade do Rio Paraná ameaçada. **Ciência Hoje**, v. 334, n. 1, p.
639 36-39, March 2016.

640
641

642 MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Estrutura Regimental (ANA) - LEI Nº 9.984,**
643 **DE 17 DE JULHO DE 2000.** 2000. Disponível em:
644 <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=371>. Acessado em 22 de
645 Novembro de 2017.

646
647

648 MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em
649 matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e
650 regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, Julho 2017.

651
652

653 MORI, G. B.; DE PAULA, F. R.; DE BARROS FERRAZ, S. F.; CAMARGO, A. F. M.;
654 MARTINELLI, L. A. Influence of landscape properties on stream water quality in
655 agricultural catchments in Southeastern Brazil. **Annales de Limnologie - International**
656 **Journal of Limnology**, v. 51, n. 1, p. 11–21, Jan. 2015.

657
658

659 MURITIBA, L. Utilização de sistemas agroflorestais na restauração de mata ciliar em
660 pequenas propriedades rurais em Santo Antônio de Jesus, Bahia- Projeto Brotar
661 Nascentes. **Cadernos de Agroecologia**, Viçosa, v. 6, n. 2, p. 1-4, Nov. 2011

662
663

664 NAGY, A.; HOLLINGSWORTH, J. A.; HU, B.; STEINBRÜCK, A.; STARK, P. C.;
665 RIOS VALDEZ, C.; VUYISICH, M.; STEWART, M. H.; ATHA, D. H.; NELSON, B.
666 C.; IYER, R. Functionalization- dependent induction of cellular survival pathways by
667 CdSe quantum dots in primary normal human bronchial epithelial cells. **ACS Applied**
668 **Nano Materials**, v. 7, n. 10, p. 8397-8411, Sept. 2013.

669
670

671 NUNES, E. A.; LEMOS, C. T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T. N.; OLIVEIRA, N. C.
672 D.; SILVA, J. Genotoxic assessment on river water using diferente biological systems.
673 **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 47-53, March 2011.

674
675

676 OLIVA, M.; JOSÉ VICENTE, J.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; DOLORES
677 GALINDO-RIÑO M. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*,

678 to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal
679 and spatial variation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 151-
680 162, Sep. 2012.

681
682

683 PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; PEREIRA FILHO,
684 I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento,
685 índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de**
686 **Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, Abril 2001.

687
688

689 RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase telophase root tip chromosome
690 aberration assay on Nmethyl Nnitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl
691 methanesulfonate. **Mutation Research**, v. 390, n. 1-2, p. 121-127, April 1997.

692
693

694 SAEED, A.; HASHMI, I.; ZARE, A.; MEHRABANI-ZEINABAD, M.; ACHARI, G.;
695 HABIBI, H.R. Efficacy of UV-C photolysis of bisphenol A on transcriptome alterations
696 of genes in zebrafish embryos. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 18, n.
697 11, p. 877 - 83, Jun. 2016.

698
699

700 SILVA, R. R. P.; PIRES, O. R.; GRISOLIA, C. K. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus*
701 (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. **Toxicon**,
702 v. 58, n. 3, p. 259-264, Jun. 2011.

703
704

705 SILVA J, EDRTMANN B, HENRIQUES JAP. Genética toxicológica. Porto Alegre:
706 Editora Alcance, 2003.

707
708

709 THIELE-BRUHN S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils: a review. **Journal of**
710 **Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, n. 2, p. 145–167, April 2003.

711
712

713 TRUJILLO-JIMÉNEZ, P.; SEDEÑO-DÍAZ, J. E.; CAMARGO, J. A.; LÓPEZ-LÓPEZ,
714 E. Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse
715 indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). **Ecological**
716 **Indicators**, v. 11, n. 6, p. 1636–1646, Nov. 2011

717
718

719 VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M.
720 Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic
721 environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–
722 189, Jun. 2006.

723
724

725 VAN DER KRAAK, G. J.; HOSMER, A. J.; HANSON, M. L.; KLOAS, W.;
726 SOLOMON, K. R. Effects of atrazine in fish, amphibians, and reptiles: an analysis based

727 on quantitative weight of evidence. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 1-66,
728 Nov. 2014.
729
730
731 VELKI, M.; MEYER-ALERT, H.; SEILER, T.; HOLLERT, H. Enzymatic activity and
732 gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon
733 and diuron. **Aquatic toxicology**, v. 193, p. 1 - 42, Dec. 2017.
734
735
736 VENUGOPAL, T.; GIRIDHARAN, L.; JAYAPRAKASH, M.; VELMURUGAN, P. M.
737 A comprehensive geochemical evaluation of the water quality of River Adyar, India. **Bull.**
738 **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 211–217,
739 Sep. 2009.
740
741
742 ZEGURA, B.; HEATH, E.; CERNOSA, A.; FILIPIC, M. Combination of in vitro
743 bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater,
744 surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453-1460, Jun.
745 2009.
746
747
748 ZHANG, C. J.; WILLETT, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: an animal model for
749 toxicological studies. **Current Protocols in Toxicology**, p. 1–7, Nov. 2003.
750
751
752 WAN, R.; CAI, S.; LI, H.; YANG, G.; LI, Z.; NIE, X. Inferring land use and land cover
753 impact on stream water quality using a Bayesian hierarchical modeling approach in the
754 Xitiaoxi River Watershed, China. **Journal of Environmental Management**, v. 133, p.
755 1-11, Jan. 2014.
756
757
758 YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; SANTOS, G. S.;
759 STREMEL, T. R. O.; DORIA, H. B.; GUSSO-CHOUERI, P.; CAMPOS, S. X.;
760 ORTOLANI-MACHADO, C. F.; CESTARI, M. M.; FILIPAK NETO, F.; AZEVEDO,
761 J. C. R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure
762 to biota and human population in reservoirs from Iguaçú River (Southern Brazil).
763 **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18111-28, Jun. 2016.
764
765
766 YI, Y.J., YANG, Z.F., ZHANG, S.H. Ecological risk assessment of heavy metals in
767 sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and
768 lower reaches of the Yangtze River basin. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p.
769 2575–2585, Oct. 2011.
770
771
772
773
774
775
776

777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810

O Artigo 1 intitulado: **Influência das características da paisagem em águas superficiais de rios Sul-Matogrossenses** será submetido a **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental** (Qualis B1, Área interdisciplinar)

811 **Influência das características da paisagem em águas**
812 **superficiais de rios sul-mato-grossenses**

813
814 **Influence of landscape characteristics on surface waters of**
815 **south-mato-grossenses rivers**

816
817 **Juliana Caroline Vivian Sposito**

818 Bacharel em ciências biológicas e Doutoranda no Curso de Pós-graduação em Ciência e
819 Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Atua nas
820 áreas de mutagênese ambiental e monitoramento da qualidade da água e do ar.

821
822 **Cassiana Carolina Montagner**

823 Bacharel em Química e Doutora em Ciências pela Universidade Estadual de Campinas
824 (UNICAMP). Professora da UNICAMP. Atua nas áreas de química ambiental,
825 ecotoxicologia e no desenvolvimento e validação de métodos analíticos.

826
827 **Valter Aragão do Nascimento**

828 Graduação em Física e Doutor pela Universidade de São Paulo (USP). Professor da
829 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Atua na área de espectroscopia de
830 emissão óptica com plasma aplicada a sistema biológicos.

831
832 **Alexeia Barufatti Grisolia***

833 Graduação em Ciências Biológicas e Doutora pela Universidade Estadual Paulista Júlio
834 de Mesquita Filho (UNESP). Professora da Universidade Federal da Grande Dourados
835 (UFGD). Atua nas áreas de biologia molecular aplicada, marcadores moleculares e
836 mutagênese ambiental.

837 ***Autor correspondente.** E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br. Universidade Federal da
838 Grande Dourados (UFGD), Rodovia Dourados Itahum, Km 12 - Cidade Universitária,
839 Cx. Postal 364 - CEP 79804-970. Fone (+55) 67 3410-2256.

840
841 **Resumo**

842 O objetivo do estudo foi avaliar a composição química da água, analisar os tipos de uso
843 e cobertura do solo (%), bem como investigar a influência das características da paisagem
844 na qualidade da água em dois rios Sul-Matogrossenses. Amostras de águas superficiais
845 foram coletadas em diferentes pontos amostrais, nos rios Dourados e Brilhante,
846 localizados na Região Sul do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. As proporções de
847 uso e cobertura do solo foram mensuradas com auxílio do programa ArcGIS® e
848 categorizados seis classes de uso e cobertura do solo. Metais foram determinados por
849 meio de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.
850 Contaminantes emergentes (CEs) foram determinados usando extração em fase sólida e
851 espectrômetro de massa acoplado a cromatografia líquida. Os resultados da análise de uso
852 e cobertura do solo mostraram que as áreas no entorno do pontos de amostragem são
853 ocupadas predominantemente pela agricultura. A análise química mostrou que todos os
854 metais estavam abaixo das concentrações máximas permitidas pela resolução brasileira.
855 Em relação aos CEs, apenas sete, cafeína, imidacloprido, atrazina, 2-hidroxiatrazina,
856 tebutiurum, bisfenol A e estriol, foram determinados em ambos os rios, com exceção para
857 atrazina e estriol no rio Dourados. Observou-se que atividades antrópicas associadas a
858 redução das matas ciliares, indisponibilidade de infraestrutura para o tratamento de

859 efluentes e falta de conscientização da população podem ser considerados importantes
860 fatores de contaminação dos recursos hídricos.

861 **Palavras-chave:** Contaminação da água, metais, contaminantes emergentes.

862

863 **Abstract**

864 The objective of the study was to evaluate the chemical composition of the water, to
865 analyze the types of land use and cover (%), as well as to investigate the influence of
866 landscape characteristics on water quality in two South-Matogrossenses rivers. Surface
867 water samples were collected at different sampling sites from the Dourados and Brilhante
868 Rivers, located in the Southern Region of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The
869 proportions of land use and cover were measured using the ArcGIS® program and
870 categorized six classes of land use and occupation. Metals were determined by inductively
871 coupled plasma optical emission spectrometry. Emerging contaminants (ECs) were
872 determined using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled mass
873 spectrometer. The results of the use and land cover analysis showed that the areas around
874 the sampling points are predominantly occupied by agriculture. The chemical analysis
875 showed that all metals were below the maximum concentrations allowed by the Brazilian
876 Resolution. In relation to ECs, only seven, caffeine, imidacloprid, atrazine, 2-
877 hydroxyatriazine, tebutiurum, bisphenol A and estriol were determined in both Rivers,
878 except for atrazine and estriol in the Dourados river. Our results show that anthropogenic
879 activities associated with the reduction of riparian forests, unavailability of infrastructure
880 for the treatment of effluents and lack of awareness of the population can be considered
881 important factors of contamination of water resources.

882 **Key woDRs:** Contamination of water, metals, emerging contaminants.

883

884 **1. Introdução**

885 Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada à presença de um número
886 crescente de substâncias de origem natural ou sintética, comumente denominados de
887 contaminantes emergentes (CEs) incluindo hormônios, produtos farmacêuticos, produtos
888 para cuidados pessoais, plastificantes e defensivos agrícolas. Essas substâncias estão
889 sendo amplamente detectados, especialmente em águas superficiais, como estuários,
890 lagos e rios (Zuccato et al., 2005; Velicu e Suri, 2009; Masiá et al., 2015; Liu et al., 2017;
891 Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho, 2017)

892 Além dos CEs a presença de metais não essenciais também têm sido alvo de
893 preocupação da comunidade científica, devido à sua toxicidade, abundância e persistência
894 no ambiente. Os efeitos dos metais em águas superficiais podem ser atribuídos a
895 bioacumulação, bio-concentração e danos genéticos observados em microrganismos,
896 flora e fauna aquática, afetando a cadeia alimentar e consequentemente a saúde humana
897 (Yi, Yang e Zhang, 2011; Falandysz et al., 2017).

898 A contaminação de águas superficiais por CEs e metais têm sido associada a
899 práticas antrópicas próximas as bacias hidrográficas devido ao escoamento superficial de
900 resíduos, mineração, e descarte direto de efluentes urbano e agroindustriais. Desta forma,
901 o tipo de uso e a cobertura do solo reflete diretamente na qualidade da água dos recursos
902 hídricos (Tran et al., 2010; Oliva et al., 2012; Masiá et al., 2015).

903 A Bacia do Alto do rio Paraná fornece água para a região mais densamente
904 povoada do Brasil. O trecho do Alto do rio Paraná no Estado de Mato Grosso do Sul,
905 onde estão localizados os rios Dourados e Brilhante, flui por regiões com menor
906 densidade populacional, porém funcionam como importantes fontes de abastecimento
907 hídrico e desenvolvimento de atividades econômicas para Região Sul-Mato-Grossense
908 (Message et al., 2016). No entanto, a expressiva atividade agrícola e a ausência de

909 tratamento adequado de esgoto podem impactar negativamente a qualidade da água destes
910 recursos.

911 Investigações anteriores indicaram concentrações de metais acima dos valores
912 permitidos pela legislação brasileira para os rios Dourados e Brilhante (Maceda et al.,
913 2015; da Rocha et al., 2018). Por outro lado, em relação aos CEs ainda permanece uma
914 escassez de informações sobre a presença dos mesmos. Desta forma, afim de
915 compreender o impacto das atividades antropogênicas na qualidade dos recursos hídricos,
916 o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química da água, metais e CEs, analisar
917 os tipos de uso e cobertura do solo (%), bem como investigar a influência das
918 características da paisagem na qualidade da água em dois rios Sul-Matogrossenses.

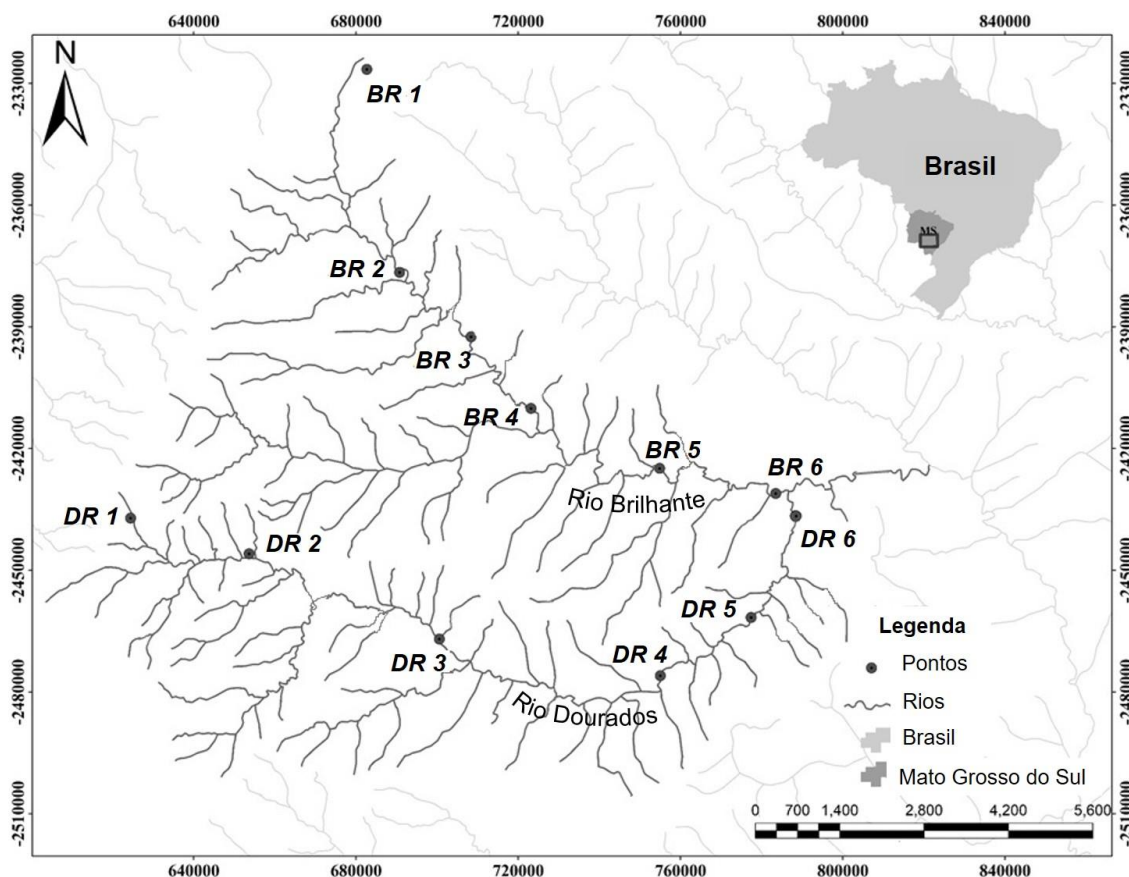
919

920 2. Material e métodos

921 2.1 Descrição da área de estudo

922 As bacias dos rios Dourados e Brilhante localizam-se na sub-bacia do rio
923 Ivinhema que, por sua vez, se insere na Bacia Hidrográfica do Alto do rio Paraná
924 (Message et al., 2016) (Figura 1). O rio Dourados (DR) nasce no município de Antônio
925 João, na fronteira de Mato Grosso do Sul com o Paraguai, e tem 370 Km de extensão,
926 banhando doze municípios dentre eles: Antônio João, Ponta Porã, Laguna Carapã,
927 Caarapó, Vicentina, Jateí, Glória de Dourados, Ivinhema, Deodópolis, Fátima do Sul,
928 Itaporã e Dourados (Ferreira e Silva, 2015).

929



930

931

932

933

934

935

936

Figura 1 Localização dos pontos de amostragem dos rios Dourados (DR) e Brilhante (BR), Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

O rio Brilhante (BR) nasce na cidade de Sidrolândia, possui uma extensão de 344 Km, banhando nove municípios inseridos total ou parcialmente em seus limites tais como: Angélica, Deodópolis, Douradina, Dourados, Itaporã, Maracaju, Ponta Porã, rio Brilhante

937 e Sidrolândia. O rio corre no sentido oeste e se uni aos rios Vacaria e Dourados ao leste
938 formando o rio Ivinhema (Ferreira e Silva, 2015).

939

940 2.2 Amostragem

941 Amostras de água foram coletadas em seis pontos ao longo do DR e BR,
942 totalizando doze pontos de amostragens. Uma amostra de água superficial foi coletada
943 em cada pontos de amostragem, em junho de 2016, a uma profundidade de 20 cm,
944 utilizando garrafas de vidro âmbar esterilizadas 1L. Após a coleta, amostras de água
945 foram transportadas sob refrigeração e armazenadas a 4 °C até o momento das análises. A
946 seleção dos pontos de amostragem, foi associada às características dos rios, da nascente
947 a foz, e atividades desenvolvidas nas proximidades, conforme Tabela 1.

948

949 **Tabela 1** Caracterização dos pontos de amostragem dos rios Dourados e Brilhante.

Rio	Pontos	Caracterização da área de estudo
Rio Dourados (DR)	DR 1	Nascente no município de Antônio João. Área predominantemente agrícola.
	DR 2	Área predominantemente agrícola com presença de mata ciliar.
	DR 3	Ponto próximo a cidade de Dourados. Áreas agrícola e urbana, com mata ciliar.
	DR 4	Ponto próximo a cidade de Fátima do Sul. Área urbana.
	DR 5	Ponto localizado após as cidades de Fátima do Sul e Vicentina. Área agrícola.
	DR 6	Área agrícola e alagada.
Rio Brilhante (BR)	BR 1	Nascente no município de Sidrolândia. Área urbana e agrícola.
	BR 2	Área agrícola, urbana e com mata ciliar.
	BR 3	Ponto próximo a cidade de Maracajú. Área agrícola, urbana e com mata ciliar.
	BR 4	Área predominantemente agrícola e com mata ciliar.
	BR 5	Ponto localizado após a cidade de Douradina. Área agrícola.
	BR 6	Ponto localizado após a cidade de Rio Brilhante. Área agrícola e com pastagem.

950

951 2.3 Uso e cobertura do solo

952 As proporções de uso e cobertura do solo nos pontos de amostragem foram
953 mensuradas em junho de 2016 usando imagens aéreas de alta resolução, obtidas do
954 Google Earth Pro®, com tamanho de pixel (célula) de 1 m. Para o limite do estudo, foram
955 gerados buffers de 1,5 km em torno de cada local de amostragem (12 locais), sendo
956 categorizados seis classes de uso e cobertura do solo: agricultura, pastagens, edificações
957 urbanas, fragmentos florestais, corpos d'água e áreas úmidas. Para a interpretação das
958 imagens, utilizou-se uma classificação visual utilizando as ferramentas de escaneamento
959 fornecidas pelo programa ArcGIS® 10.4 em sua versão de teste (ESRI, 2015), calculando
960 as áreas e porcentagens de cada categoria de cobertura do solo.

961

962 2.4 Determinação de metais

963 Considerando trabalhos prévios desenvolvidos no DR e BR, onde foram
964 observados concentrações de metais acima do permitido para a legislação brasileira, o
965 presente trabalho analisou a presença dos metais cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn),
966 cromo (Cr), alumínio (Al) e cobalto (Co). Após a coleta, amostras de água foram
967 acidificadas com ácido nítrico para preservação dos metais (ANA, 2011) e para cada
968 amostra foram analisadas três subamostras. As concentrações de cada elemento nas
969 amostras de água foram determinados segundo metodologia proposta por Mermet e
970 Poussuel (1995) em Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente
971 Acoplada (ICP-OES) (Thermo Scientific, EUA, modelo iCAP 6000®), utilizando gás
972 argônio de alta pureza (99,99%) (White Martins). Metais foram determinados utilizando
973 curvas de calibração padrão, a partir de solução padrão multielementar com 1000 mg L⁻¹
974 de Cu e Zn e de 100 mg L⁻¹ de Mn, Cr, Al e Co (Merck e Sigma Aldrich®). A validação

975 do procedimento analítico ICP-OES foi realizado para determinação quantitativa dos
976 elementos com comprimentos de onda e de linearidade (Tabela 2).

977
978
979
980
981

Tabela 2 Validação do método, série ICAP 6000-Duo, Thermo Scientific, nebulização pneumática. Elementos com comprimentos de onda (nm) e linearidade (R²).

Metais	Comprimentos de onda (nm)	Linearidade (R ²)
Al	308,215	0,9763
Co	228,616	0,9999
Cr	283,563	0,9997
Cu	327,396	0,9962
Mn	257,610	0,9999
Zn	213,856	0,9960

982

983 2.5 Determinação de contaminantes emergentes (CEs)

984 Considerando as atividades agrícolas e urbanas em torno do DR e BR, este estudo
985 determinou a presença de vinte e um CEs tais como: cafeína, imidacloprido, carbendazim,
986 atrazina, 2-hidroxiatrazina, carbofurano, hexazinona, tebutiuron, diuron, clomazone,
987 ametryn, malathion, testosterona, tebuconazole, progesterona, estriol, 17 α -etinilestradiol,
988 bisfenol A, fipronil, triclosan e octilfenol.

989 O preparo da amostra foi realizado segundo Montagner e Jardim (2011), com
990 adaptações. Amostras de água foram processadas durante as 24 h seguintes a coleta. Cada
991 amostra de 1L foi filtrada utilizando membranas de acetato de celulose com tamanho de
992 poro de 0,45 μ m (Sartorius, Alemanha), e o filtrado foi extraído usando cartuchos de 500
993 mg de HLB Oasis (Waters, Milford, EUA). O condicionamento dos cartuchos foi
994 realizado pela adição de 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. Os compostos retidos
995 foram eluídos com duas alíquotas de 5 mL de metanol e uma alíquota de 2 mL de
996 acetonitrila. A etapa de eluição foi realizada com auxílio de um sistema de vácuo tipo
997 Manifold (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA) com tubos de vidro pré-lavados. Os tubos
998 foram cuidadosamente secos com um fluxo suave de nitrogênio, e os compostos foram
999 ressuspensos até um volume final de 0,4 mL de água/metanol 70/30 (v/v).

1000 A análise foi realizada utilizando cromatografia líquida com espectrômetro de
1001 massa (LC-MS/MS), em um sistema LC Agilent série 1200, acoplado a um espectro de
1002 massa Agilent 6410 Triple Quad equipado com uma fonte de ionização por electrospray
1003 (ESI). Monitoramento de Reação Múltipla (MRM) foi usado para realizar a quantificação
1004 por espectrometria de massa. A quantificação foi feita por meio de calibração padrão
1005 externa e o limite de detecção instrumental (LDI) variou entre 5 e 250 pg (Tabela 3). Os
1006 limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método consideraram o fator de
1007 concentração (2000x) e foram obtidos de acordo com Miller e Miller (2005).

1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018

Tabela 3 Parâmetros experimentais da cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS/MS) selecionado para os contaminantes emergentes.

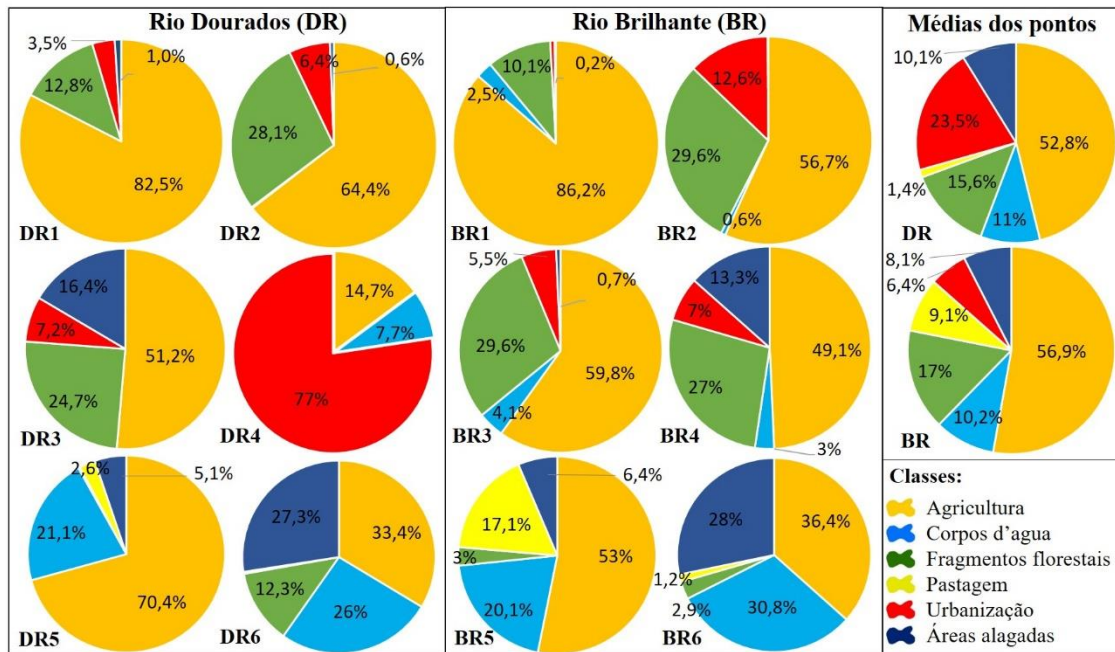
Contaminantes emergentes	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Modo ESI	Produção (m/z)			Energia de colisão (eV)			Abundância relativa (%)		Parâmetros instrumentais	Coeficiente de determinação (R ²)
											LDI (pg)		
Cafeína	3.091	195.1	(+)	138.1	110.1	69.1	15	20	20	31.7	12.0	15	0.988
Imidacloprido	1.185	256.0	(+)	208.9	175.1		10	15		7.5		25	0.922
CaBRendazim	2.324	192.1	(+)	160.1	132.1	105.1	20	30	35	24.9	18.8	5	0.985
Atrazina	5.877	216.2	(+)	174.1	103.9		15	15		17.4		5	0.851
2-hidroxiatrazina	3.091	198.2	(+)	156.2	114.1	86.1	15	20	20	40.3	66.4	5	0.991
CaBRofurano	4.491	222.0	(+)	165.0	123.0	55.0	10	20	16	22.0	15.3	5	0.988
Hezaxinona	5.071	253.2	(+)	171.1	85.1	71.1	8	30	31	80.4	53.2	5	0.992
Tebutiurum	5.243	229.1	(+)	172.1	116.1	57.2	10	30	34	56.8	41.7	5	0.944
Diuron	6.245	233.0	(+)	72.1	72.1	46	20	20	16	35.6	99.4	5	0.855
Clomazone	6.706	240.1	(+)	125.0			1			----		5	0.870
Ametryn	6.877	228.2	(+)	186.1	158.1	138.1	15	20	20	14.9	22.9	5	0.928
Malathion	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
17α-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

1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030

3. Resultados

3.1 Caracterização do uso e cobertura do solo

Em relação a caracterização do uso e cobertura do solo, verificou-se áreas ocupadas predominantemente por atividade agrícola, principalmente próximas às nascentes, com exceção para o ponto DR4, com proporção de 77 % de urbanização. Além disso, em alguns locais também foi verificado proporção considerável de corpos hídricos e áreas úmidas, como nos pontos 5 e 6 de ambos os rios. Por outro lado, fragmentos florestais apresentaram proporções reduzidas ou nenhum tipo de cobertura, como observado nos pontos DR4 e DR5 (Figura 2).



1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054

Figura 2 Uso e cobertura do solo dos pontos de amostragem, bem como média dos pontos nos rios Dourados (DR) e Brilhante (BR), Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

De acordo com à média dos pontos de amostragem, verificou-se que a agricultura é a principal atividade antrópica desenvolvida ao longos dos rios, com uma proporção de 52,8 % e 56,9 %, enquanto a atividade urbana ocupa uma área menor de 23,5 % e 6,4 %, no DR e BR, respectivamente. Os fragmentos florestais foram responsáveis por aproximadamente 15.6 % no DR e 17 % no BR. Por outro lado, a média da proporção dos demais usos e ocupações do solo podem ser consideradas baixas.

3.2 Concentração de metais na água

Em ambos os rios verificou-se a presença dos metais Cu, Zn, Mn, Cr, Al e Co, com exceção para o metal Zn não quantificado no BR. Contudo, as concentrações foram inferiores à concentração máxima permitida segundo Resolução Brasileira do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), conforme apresentado na Tabela 4.

1055

Tabela 4 Concentração de metais (mg L⁻¹) em amostras de água dos rios Dourados e Brilhante.

Pontos de Amostragem		Elementos (mg L ⁻¹)					
		Cobre (Cu)	Zinco (Zn)	Manganês (Mn)	Cromo (Cr)	Alumínio (Al)	Cobalto (Co)
Rio Dourados (DR)	DR 1	0.0024	<LQ	0.0280	0.0067	0.0256	0.0011
	DR 2	0.0026	0.0067	0.0160	0.0067	<LQ	0.0005
	DR 3	0.0025	0.0003	0.0320	0.0068	<LQ	0.0009
	DR 4	0.0019	<LQ	0.0488	0.0071	<LQ	0.0010
	DR 5	0.0026	<LQ	0.0373	0.0065	<LQ	0.0007
	DR 6	0.0024	<LQ	0.0265	0.0070	<LQ	0.0007
Rio Brilhante (BR)	BR 1	0.0022	<LQ	0.0325	0.0075	<LQ	0.0004
	BR 2	0.0028	<LQ	0.0383	0.007	0.0086	0.0009
	BR 3	0.0028	<LQ	0.0380	0.0073	<LQ	0.0007
	BR 4	0.0018	<LQ	0.0230	0.0073	<LQ	0.0006
	BR 5	0.0022	<LQ	0.0311	0.0074	<LQ	0.0006
	BR 6	0.0018	<LQ	0.0356	0.0067	0.0642	0.0005
^a CONAMA		0.009	0.18	0.10	0.05	0.10	0.05

1056

^aResolução 357/2005, classe 2, conforme Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Menor que o limite de quantificação (<LQ).

1057

1058

1059

3.3 Concentração de Contaminantes Emergentes (CEs)

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

Tabela 5 Concentrações de contaminantes emergentes com respectivos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) (ng L⁻¹) em amostras de água proveniente dos pontos dos rios Dourados e Brilhante, e classificação toxicológica segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018).

Pontos de amostragem		Contaminantes emergentes (CEs) (ng L ⁻¹)						
		Cafeína	Bisfenol A	Estriol	Imidacloprido	Atrazina	2-hidroxiatrazina	Tebutiurum
Rio Dourados (DR)	DR 1	<LQ	18,8	<LD	<LD	<LQ	18,6	<LD
	DR 2	<LQ	11,3	<LD	<LD	<LD	19,0	<LD
	DR 3	20,0	<LQ	<LD	<LQ	<LQ	20,9	<LQ
	DR 4	34,5	13,3	<LD	20,6	<LQ	31,2	<LQ
	DR 5	45,9	16,8	<LD	21,0	<LQ	29,6	<LQ
	DR 6	21,7	21,4	<LD	30,1	<LQ	47,8	10,4
Rio Brilhante (BR)	BR 1	50,5	<LD	<LD	16,3	171,3	129,5	<LD
	BR 2	<LQ	<LD	<LD	53,5	25,1	55,1	11,9
	BR 3	31,3	17,0	<LD	23,8	19,1	52,3	<LQ
	BR 4	21,6	<LQ	<LD	17,9	17,1	51,5	10,4
	BR 5	26,7	<LD	<LD	27,3	24,6	66,5	33,9
	BR 6	<LQ	22,7	10,7	42,2	28,2	92,9	22,2
LD		6	9	9	5,3	3,9	2,7	3,0
LQ		19,8	29,7	29,7	17,4	12,8	9,0	9,9
ANVISA (Classe)		ND	ND	ND	III	III	ND	II

1069

Classificação toxicológica para agrotóxicos: I: extremamente tóxico; II: altamente tóxico; III: medianamente tóxico; IV: pouco tóxico (ANVISA, 2018). (ND) Dado não disponível.

1070

1071

1072

4. Discussão

1073

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

A análise de uso e cobertura do solo revelou que os rios são ocupados predominantemente por atividades agrícolas. Por outro lado, os fragmentos florestais classificados como floresta estacional semidecidual, foram observados em proporções reduzidas ou com nenhum tipo de cobertura, como observado nos pontos DR4 e DR5 (Figura 2). O Brasil, por meio do Código Florestal Brasileiro, dispõe sobre a proteção da vegetação nativa e estabelece as Áreas de Preservação Permanente (APP) com função de preservar beiras de rios e proteger nascentes (Brasil, 2012). Contudo, considerando que em algumas áreas os fragmentos florestais nem sempre estão presentes, os dados do

1081 presente estudo indicam que as normas estabelecidas pelo Código Florestal Brasileiro não
1082 estão sendo aplicadas.

1083 A presença de áreas urbanas e agrícolas próximas aos recursos hídricos têm sido
1084 associadas ao descarte de efluentes ou escoamento superficial de resíduos domésticos,
1085 industriais e agropecuários, acarretando em contaminação dos corpos d'água por metais
1086 (Mwegoha e Kihampa, 2010). Assim, órgãos que visam a proteção dos recursos hídricos
1087 como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) têm estabelecido
1088 concentrações máximas permitidas para os metais em águas superficiais. Investigações
1089 anteriores indicaram concentrações de metais acima dos valores permitidos para ambos
1090 os rios, DR e BR (Maceda et al., 2015; da Rocha et al., 2018). Contudo, neste estudo, esse
1091 mesmo resultado não foi observado, o que pode ser atribuído a diferente localização dos
1092 pontos e período de amostragem.

1093 Além dos metais, CEs também têm sido amplamente detectados em águas
1094 superficiais. Geralmente empregado como estimulante, a cafeína é um dos produtos mais
1095 consumidos no mundo, sendo comumente encontrada no café, cacau, bebida de cola,
1096 chocolate e em alguns medicamentos (Bortolini, Sicka e Foppa, 2010). Além do mais, no
1097 Brasil, os estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul
1098 são os que mais consomem a erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. -Hil) na forma de
1099 bebida (chimarrão, tererê ou chá mate) (Bondarik et al. 2006). Podem ser encontrados
1100 composto estimulantes como a cafeína (Bastos et al. 2006).

1101 A cafeína foi detectada no DR a partir do ponto DR3, com 20,0 ng L⁻¹, situado
1102 próximo ao município de Dourados, considerada a segunda cidade com maior número de
1103 habitantes (218.000) do Estado de Mato Grosso do Sul (IBGE, 2017). A contaminação
1104 do DR pode estar associada ao descarte de águas residuais urbanas (da Rocha et al., 2018).
1105 A cafeína é considerada um indicador da poluição de águas superficiais por águas
1106 residuais domésticas (Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho, 2017). Assim como no DR, no
1107 BR foram quantificadas concentrações de cafeína de até 50,5 ng L⁻¹, como observado no
1108 ponto BR1. Considerando que o DR e o BR passam por doze e nove municípios,
1109 respectivamente, a variação nos níveis de concentração da cafeína pode ser atribuída a
1110 inúmeros aspectos, tais como padrão de consumo, número de habitantes e falta de
1111 saneamento adequado, uma vez que, apesar das estações de tratamento de esgoto (ETE)
1112 promoverem a remoção de CEs, alguns compostos, como a cafeína, não são efetivamente
1113 removidos do esgoto após tratamento, devido as suas propriedades físico-químicas (alta
1114 estabilidade, solubilidade, tempo de meia-vida de 30 dias) permanecendo no efluente
1115 final e, assim, remanescendo em corpos d'água superficiais (Buerge et al., 2003;
1116 Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho, 2017).

1117 O bisfenol A também têm sido classificado como CEs, por estar presente em
1118 matrizes aquáticas, devido atividades antrópicas, e por isso têm sido detectado em
1119 amostras de esgoto bruto e tratado (Montagner, Vidal e Acayaba, 2017), águas destinadas
1120 ao consumo humano (Machado et al., 2016) e águas superficiais (Liu et al., 2017). O
1121 bisfenol A tornou-se onipresente no ambiente por ser empregado em atividades
1122 industriais, bem como na utilização de embalagens contendo esse composto. Assim,
1123 durante o uso e descarte inadequado, a eliminação de produtos contendo bisfenol A no
1124 ambiente é inevitável (Tsai, 2006).

1125 Neste estudo, o bisfenol A foi determinado em todos os pontos do DR, com
1126 exceção para o ponto 3, com concentrações de 11,3 a 21,4 ng L⁻¹. Por outro lado, no BR
1127 o mesmo foi determinado somente nas amostras dos pontos 3 e 6 com 17,0 e 22,7 ng L⁻¹
1128 respectivamente. Assim como a cafeína, a contaminação por bisfenol A, nos recursos
1129 hídricos pode estar associada ao descarte de águas residuais urbanas. No Brasil, o descarte
1130 direto de esgoto bruto nos rios representa a principal fonte de aporte de contaminantes de

1131 origem doméstica para águas superficiais, uma vez que, segundo a Pesquisa Nacional de
1132 Saneamento (PNSB) de 2008, pouco mais da metade dos municípios brasileiros (55,2%)
1133 possuem serviço de esgotamento sanitário por rede coletora (IBGE, 2010; INCTAA,
1134 2014).

1135 Dentre os CEs, alguns compostos são ainda classificados pelo seu potencial em
1136 alterar funções do sistema endócrino nos organismos vivos e persistirem nos recursos
1137 hídricos após tratamento (Velicu e Suri, 2009; Lima et al., 2014). Assim, interferentes
1138 endócrinos como o estriol no ambiente aquático está se tornando uma prioridade em
1139 programas de monitoramento. Neste estudo, o estriol, foi determinado somente no ponto
1140 BR6 com 10,7 ng L⁻¹. Concentrações para o estriol também foram apresentados por
1141 Kuster et al. (2009), verificando uma média na concentração de 3,68 ng L⁻¹ em amostras
1142 de água ambientais do Estado do Rio de Janeiro (Brasil). Em relação ao impacto
1143 ambiental dos níveis reportados neste estudo, pesquisas com bio-ensaios e organismos
1144 aquáticos devem ser realizadas afim de avaliar atividade estrogênica, considerando que
1145 onde os níveis totais ultrapassam a margem de 10 ng L⁻¹ existe um risco potencial de
1146 efeitos de desregulação endócrina.

1147 Uma outra classe de contaminantes preocupantes sob o ponto de vista ambiental
1148 é a dos defensivos agrícolas. No ano de 2016, a região centro-oeste foi a maior
1149 comercializadora de agroquímicos no Brasil, com um total de 185.530,03 toneladas. O
1150 Estado de Mato Grosso do Sul ocupa o terceiro lugar nesta classificação, com um total de
1151 33.003,46 toneladas (20,3%), estando atrás dos Estados do Mato Grosso e Goiás
1152 (IBAMA, 2016). A expansão da área agrícola aliada ao desmatamento em áreas próximas
1153 as margens dos rios podem proporcionar a contaminação dos recursos hídricos por
1154 defensivos agrícolas, dentre eles inseticidas, herbicidas e praguicidas.

1155 O imidacloprido corresponde ao décimo inseticida neonicotinóide mais
1156 comercializado (9.165,97 toneladas) no Brasil (IBAMA, 2014). O Inseticida foi detectado
1157 nos pontos DR4, DR5 e DR6 com as respectivas concentrações de 20,6; 21,0 e 30,1 ng
1158 L⁻¹, que correspondem aos pontos com menor proporção de fragmentos florestais (Figura
1159 2). As florestas contribuem para a manutenção da qualidade dos recursos hídricos
1160 interrompendo o transporte de agroquímicos para os recursos hídricos (Dosskey et al.,
1161 2010; Freitas et al., 2013). Assim, a depreciação da qualidade da água pode ocorrer em
1162 locais com intensa pressão antrópica e redução das matas ciliares como observado nos
1163 pontos DR4, DR5 e DR6. Além do mais, a ausência da mata ciliar evidencia que as
1164 normas do Código Florestal Brasileiro não estão sendo respeitadas.

1165 Com base em estudos laboratoriais agudos e crônicos e experimentos de semi-
1166 campo, Smit et al. (2015) conclui que o padrão de qualidade da água para exposição ao
1167 imidacloprido deve ser definida para 8,3 ng L⁻¹. Desta forma, o inseticida imidacloprido,
1168 determinado em todos os pontos do BR com concentrações entre 16,3 a 53,5 ng L⁻¹, pode
1169 estar comprometendo a qualidade da água nestes recursos hídricos. A presença de
1170 agroquímicos na água devido atividades agrícolas desordenadas é uma das principais
1171 causas de degradação das águas superficiais. A aplicação do imidacloprido resulta em
1172 potencial contaminação dos recursos hídricos devido a uma variedade de fatores,
1173 incluindo deriva de pulverização, deposição atmosférica, erosão do solo e escoamento
1174 superficial (CCME, 2007).

1175 No Brasil, a atrazina é amplamente utilizada no controle de plantas daninhas,
1176 sendo o quarto herbicida mais comercializado (28.615,70 toneladas) e determinado em
1177 todo o território nacional, com uma frequência de detecção de 75 % (IBAMA, 2014;
1178 Montagner, Vidal e Acayaba, 2017). Neste estudo, a atrazina não foi determinada em
1179 nenhum ponto amostral do DR. Considerando que alguns agroquímicos muitas vezes são
1180 restritos a um tipo de cultura, este resultado pode ser atribuído as diferentes práticas

1181 agrícolas desenvolvidas nas proximidades do rio. Segund Azevedo et al. (2004) o
1182 pesticida atrazina foi encontrado no Rio Paraíba do Sul (RJ), em áreas próximas à lavoura
1183 de cana. Por outro lado, a atrazina foi observada em todos os pontos do BR com
1184 concentrações de 17,1 a 171,3 ng L⁻¹, a mais alta em relação aos demais CEs monitorados.

1185 Embora as legislações vigentes no Brasil estipulem valores máximos permitidos
1186 para defensivos agrícolas em água, somente algumas substâncias com registro para o uso
1187 no país são contempladas. Contudo, a Resolução n. 357 de 2005 que regulamenta o
1188 controle da qualidade das águas superficiais no Brasil não estabelece limite para as
1189 moléculas analisadas neste estudo, com exceção para a atrazina. Apesar de estar abaixo
1190 do valores estabelecidos pela legislação brasileira (2000 ng L⁻¹) para águas superficiais
1191 (CONAMA, 2005), a atrazina está incluída entre os contaminantes de preocupação
1192 emergente por ser considerada medianamente tóxica segundo classificação toxicológica
1193 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018), assim como o
1194 imidacloprido. Além do mais, a sua remoção de águas superficiais com finalidade potável
1195 ainda é um desafio (Ghosh e Philip, 2006; Fairbairn et al., 2016). Assim, a detecção da
1196 atrazina, é uma informação importante para as autoridades devido seu potencial
1197 estrogênico e consequente ameaça à biota aquática (Hayes et al., 2003)

1198 A presença da atrazina pode estar associada a forte influência agrícola observada
1199 no BR (56,9 %) em relação ao DR (52,8 %), assim como também foi verificado que para
1200 ambos os compostos, maiores concentrações no ponto BR1, ocupado predominantemente
1201 pela agricultura (Figura 2). O potencial de contaminação da atrazina pode ser atribuído à
1202 sua alta capacidade de lixiviação, escoamento superficial e tempo de meia-vida de 2
1203 meses a 6 anos (Graymore et al., 2001).

1204 A determinação dos compostos de degradação da atrazina, como a 2-
1205 hidroxiatrazina é importante para se entender o destino deles no ambiente mesmo após
1206 um longo período da aplicação (Moreira et al., 2017). A 2-hidroxiatrazina foi determinada
1207 em todos os pontos de amostragem, em concentrações variando de 18,6 a 47,8 ng L⁻¹ no
1208 DR e 51,5 a 129,5 ng L⁻¹ no BR, presumivelmente devido à ampla gama de aplicações.
1209 Contudo, verificou-se a maior concentração do 2-hidroxiatrazina (129,5 ng L⁻¹) no ponto
1210 BR1 que corresponde a nascente, assim como para a atrazina (171,3 ng L⁻¹), que pode ser
1211 atribuído a degradação do mesmo e a forte influência agrícola neste ponto (86,2 %).

1212 As nascentes desempenham influência direta sobre a hidrologia da bacia.
1213 Contudo, essas áreas têm sido alvo de pressões antrópicas, devido a proximidade com o
1214 curso d'água. Por este motivo, as matas ciliares são propensas a derrubadas, dando lugar
1215 às atividades agrícolas e à ausência de vegetação ao longo dos cursos d'água. Desta
1216 forma, práticas agrícolas intensas propiciam uma fonte importante de contaminação, uma
1217 vez que o escoamento superficial das águas de chuva não encontra barreiras em seu
1218 percurso, indo desaguar diretamente no corpo d'água podendo carrear os agroquímicos
1219 aplicados na área agrícola (Bartley et al., 2006).

1220 Considerado altamente tóxico segundo classificação toxicológica da ANVISA, o
1221 herbicida tebutiurum foi determinado apenas no ponto DR5 com 10,4 ng L⁻¹ e nos pontos
1222 BR2, BR4, BR5 e BR6 de 10,4 a 33,9 ng L⁻¹. Segundo ANVISA, o tebutiurum possui
1223 algumas restrições quanto a sua aplicação, sendo recomendado no controle de plantas
1224 daninhas em cana de açúcar, pastagem e em áreas urbanas. Maiores concentrações de
1225 tebutiurum foram observadas no ponto BR5 (33,9 ng L⁻¹) que pode estar associado a uma
1226 área destinada a pastagem (17,1 %), contribuindo assim para sua maior concentração
1227 neste ponto.

1228 De maneira geral, os resultados para os defensivos agrícolas apresentados na
1229 Tabela 5, sugerem que a atividade agrícola na região é uma das principais causas de
1230 contaminação dos recursos hídricos, principalmente no BR com maior proporção de áreas

1231 agrícolas, que pode ser atribuído ao uso excessivo de agroquímicos, escoamento
1232 superficial, além de baixa proporção de mata ciliar próximos aos pontos de amostragem.
1233 Por outro lado, menores concentrações e menor número de agroquímicos determinados
1234 no DR, pode ser atribuído a fatores como tipo de solo, declividade, presença de cobertura
1235 vegetal e o tipo de uso e cobertura do solo.

1236

1237 **5. Conclusão**

1238 A depreciação da qualidade dos recursos hídricos por metais e CEs, pode ser
1239 atribuída a fatores como redução das matas ciliares, indisponibilidade ou precariedade de
1240 infraestrutura para o tratamento de efluentes, bem como a falta de conscientização da
1241 população quanto ao descarte direto de esgoto bruto e a práticas agropecuárias próximas
1242 as nascentes e leitos dos rios. Considerando a importância das bacias hidrográficas, a
1243 adoção de práticas agrícolas mais racionais pelos agricultores e medidas como proteção
1244 das matas ciliares associado a fiscalização para cumprimento das normas estabelecidas
1245 pelo código florestal brasileiro, bem como maior investimento em infraestrutura para o
1246 tratamento de efluentes, podem prevenir a contaminação dos recursos hídricos, sendo a
1247 forma mais eficiente de controle da poluição nas condições locais.

1248

1249 **Agradecimentos**

1250 Os autores agradecem a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
1251 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a Universidade Estadual de
1252 Campinas (UNICAMP) pelo apoio logístico, a Coordenação de Aperfeiçoamento de
1253 Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do
1254 Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo apoio
1255 financeiro.

1256

1257 **6. Referências**

1258 Agência Nacional das Águas (ANA). *Guia Nacional de Coleta e Preservação de*
1259 *Amostras. Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos*, 2011 (On-
1260 line). Disponível em:

1261 <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>. Acessado em 24 de Maio de 2018

1263 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Regularização de Produtos –*
1264 *Agrotóxicos. Monografias Autorizadas* (On-line). Disponível em:
1265 <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acessado em: 01 de Maio de 2018.

1267 Azevedo, D.A., Guchon, E., Reis, E. O. *Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic*
1268 *hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil*. Journal of the Brazilian
1269 Chemical Society, v.15, n. 2, p.292-299, Mar./Apr. 2004.

1270 Bartley, R. et al. *Runoff and erosion from Australian's tropical semi-arid rangelands:*
1271 *Influence of ground cover for differing space and time scale*. Hydrological Processes, v.
1272 20, n. 15, p. 3317-3333, Sept. 2006.

1273 Benner, J. et al. *Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in*
1274 *drinking water treatment processes?* Water Res, v. 47, n. 16, p. 5955–5976, Oct. 2013.

1275 Bondarik, R., Kovaleski, J.L. Pilatti, L.A. *A produção de erva-mate e o início da atividade*
1276 *industrial no estado do Paraná*. In: II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos
1277 Gerais. Ponta Grossa, Brasil, 2006.

1278 Bastos, D.H.M., Fornari, A.C., Queiroz, Y.S. Torres, E.A.F.S. *Bioactive Compounds*
1279 *Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (Ilex*

1280 *paraguariensis*) Leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 49, n. 3, p.
1281 399-404, May 2006.

1282 Bortolini, K., Sicka, P., Foppa, T. *Determinação do teor da cafeína em bebidas*
1283 *estimulantes*. Revista Saúde - UNG-SER, v. 4, n. 2, 2010.

1284 Brasil. Lei Nº 12.651, de 25 de Maio de 2012. *Código Florestal Brasileiro* [on line].
1285 Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm)
1286 [2014/2012/lei/l12651.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm). Acessado em: 30 de Abril de 2018.

1287 Bua, H. et al. *Relationships between land use patterns and water quality in the Taizi River*
1288 *basin, China*. Ecological Indicators, v. 41, p. 187–197, Jun. 2014.

1289 Buerge, I.J. et al. *Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of*
1290 *surface waters*. Environ Sci Technol, v. 37, n. 4, p. 691–700, 2003.

1291 Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). *Canadian water quality*
1292 *guidelines for the protection of aquatic life: Imidacloprid*. 2007. Disponível em:
1293 <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/187>. Acessado em: 01 de Maio de 2018.

1294 Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2005. Resolução nº357. Diário
1295 Oficial da União de 17 de Março de 2005. Disponível em:
1296 <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acessado em: 17 de
1297 Novembro de 2017.

1298 da Rocha, M.P. et al. *Tools for monitoring aquatic environments to identify anthropic*
1299 *effects*. Environ Monit Assess, v. 190, n. 61, p. 61, 2018.

1300 Dosskey, M.G. et al. *The role of riparian vegetation in protecting and improving chemical*
1301 *water quality in streams*. J Am Water Resour Assoc, v. 46, n. 2, p. 261-277, April 2010.

1302 Environmental Systems Research Institute (ESRI). ArcGIS test GIS for the desktop,
1303 versão 10.3. ArcGIS® and ArcMap™ are the intellectual property of Esri. Copyright ©
1304 Esri. All rights reserved. For more information about Esri® software, please visit
1305 www.esri.com, 2015.

1306 Fairbairn, D.J. et al. *Sources and transport of contaminants of emerging concern: a two-*
1307 *year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed*.
1308 Sci Total Environ, v. 551–552, n. 1, 605-613, May 2016.

1309 Falandysz, J., Chudzińska, M., Barańkiewicz, D., Drewnowska, M., Hanć, A. *Toxic*
1310 *elements and bio-metals in Cantharellus mushrooms from Poland and China*. Environ
1311 Sci Pollut Res, v. 24, n. 12, p. 11472, March 2017.

1312 Ferreira, P. *Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic*
1313 *ecosystems*. Cad. Saude Publica, v. 21, n. 6, p. 1884-1892, Nov./Dec. 2005.

1314 Ferreira, P.S., Silva, C.A. *Caracterização do uso das terras da bacia hidrográfica do Rio*
1315 *Brilhante – MS, a expansão da cana-de-açúcar (2005)*. Disponível em:
1316 <http://www.enanpege.ggf.br/2015/anais/arquivos/19/538.pdf>. Acessado em: 26 de Abril
1317 de 2018.

1318 Freitas, E.P., Moraes, J.F.L., Peche Filho, A. *Indicadores ambientais para áreas de*
1319 *preservação permanente*. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 17,
1320 n. 4, p. 443–449, 2013.

1321 Ghosh, P.K., Philip, L. *Environmental significance of atrazine in aqueous systems and its*
1322 *removal by biological processes: an overview*. Global NEST Journal, v. 2, n. 2, p. 159–
1323 178, 2006.

1324 Gonçalves, E.S., Rodrigues, S.V., Silva-Filho, E.V. *The use of caffeine as a chemical*
1325 *marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial*
1326 *variations in Teresópolis, Brazil*. Rev. Ambient. Água, v. 12, n. 2, p. 192-202, Dec. 2017.

1327 Graymore, M.; Stagnitti, F.; Allinson, G. *Impacts of atrazine in aquatic ecosystems*.
1328 Environ. Int. 2001, 26, 483.

1329 Hayes, T. et al. *Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs*
1330 *(Rana pipiens); laboratory and field evidence*. Environ. Health Perspect, v. 111, n. 4, p.
1331 568-575, Apr. 2003.

1332 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010) *Pesquisa Nacional de*
1333 *Saneamento Básico, 2008*. Disponível em:
1334 <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45351.pdf>. Acessado em: 30 de Abril
1335 de 2018.

1336 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)
1337 (2014) *Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no*
1338 *Brasil*. Disponível em:
1339 http://ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=54
1340 6. Acessado em: 28 de Abril de 2018.

1341 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)
1342 (2016) *Histórico de comercialização de Químicos e Biológicos: 2000 - 2016*.
1343 [http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-](http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao)
1344 [agrotoxicos#historicodecomercializacao](http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao). Acessado em: 28 de Abril de 2018.

1345 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017).
1346 <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/por-cidade-estado-estatisticas.html>.
1347 Acessado em: 30 de Abril de 2018.

1348 Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) *Caféina*
1349 *em águas de abastecimento no Brasil*; Canela, M. C.; Jardim, W. F.; Sodré, F. F.; Grassi,
1350 M. T., eds.; Cubo: São Carlos, 2014, cap. 1.5.

1351 Kuster, M. et al. *Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in*
1352 *environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil)*. Environment International, v. 35, n.
1353 7, p. 997-1003, May 2009.

1354 Lima, D.R.S et al. *Evaluation of removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in*
1355 *drinking water by clarification at bench scale*. Quím. Nova, v. 37, n. 5, p. 783-788, Jun.
1356 2014.

1357 Liu, Y. et al. *Occurrence, distribution and risk assessment of suspected endocrine-*
1358 *disrupting chemicals in surface water and suspended particulate matter of Yangtze River*
1359 *(Nanjing section)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 135, p. 90-97, Jan. 2017.

1360 Maceda, E.B. et al. *Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego*
1361 *Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil*. Rev. Ambient. Água, v. 10, n. 1, p. 117-
1362 129, Sep./Nov. 2015.

1363 Masiá, A. et al. *Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain)*
1364 *and comparison with historical data*. Sci Total Environ, v. 503–504, n. 15, p. 58-68, Jan.
1365 2015.

1366 Mermet, J., Poussel, E. *ICP Emission Spectrometers: 1995*. Analytical Figures of Merit.
1367 Applied Spectroscopy, v. 49, n. 10, p. 12-18, 1995.

1368 Message, H.J. et al. *Planícies de inundação a Biodiversidade do Rio Paraná ameaçada*.
1369 Ciência Hoje, v. 334, n. 1, p. 36-39, March 2016.

1370 Miller, J.C., Miller, J.N. (2005). *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*.
1371 Harlow, England.

1372 Milhome, M.A.L. et al. *Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e*
1373 *subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE*. Eng Sanit
1374 Ambient, v. 14 n. 3, p. 363-372, July/Sept. 2009.

1375 Montagner, C. C., Jardim, W. F. *Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and*
1376 *endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil)*. J. Braz. Chem. Soc.,
1377 v. 22, n. 8, p. 1452, Aug. 2011.

1378 Montagner, C.C., Vidal, C., Acayaba, R.D. *Contaminantes emergentes em matrizes*
1379 *aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios.*
1380 *Quim. Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, Julho 2017.

1381 Moreira, A.J. et al. *The process of atrazine degradation, its mechanism, and the formation*
1382 *of metabolites using UV and UV/MW photolysis.* *Journal of Photochemistry and*
1383 *Photobiology A: Chemistry*, v. 347, n. 1, p. 160-167, Oct. 2017.

1384 Mwegoha, W.J.S., Kihampa, C. *Heavy Metal Contamination in Agricultural Soils and*
1385 *Water in Dar es Salaam City, Tanzania.* *African Journal of Environmental Science and*
1386 *Technology*, v. 4, n. 11, p. 763-769, Nov. 2010.

1387 Oliva, M. et al. *Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, Solea senegalensis, to assess*
1388 *the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial*
1389 *variation.* *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 75, n. 1, p. 151-162, Sep. 2012.

1390 Rousseau, A.N. et al. *Modeling the effects of agricultural BMPs on sediments, nutrients,*
1391 *and water quality of the Beaurivage river watershed (Quebec, Canada).* *Canadian Water*
1392 *Resources Journal.*, v. 38, n. 2, p. 99-120, Jun. 2013.

1393 Stackelberg, P.E. et al. *Persistence of pharmaceutical compounds and other organic*
1394 *wastewater contaminants in a conventional drinking-water treatment plant.* *Sci Total*
1395 *Environ*, v. 329, n. 1-3, p. 99-113, Aug. 2004.

1396 Smit, C.E. et al. *Ecotoxicity of Imidacloprid to Aquatic Organisms: Derivation of Water*
1397 *Quality StandARDS for Peak and Long-Term Exposure.* *Human and Ecological Risk*
1398 *Assessment*, v. 21, p. 1608-1630, May 2015.

1399 Tran, C.P. et al. *Land-use proximity as a basis for assessing stream water quality in*
1400 *New York State (USA).* *Ecol Indic*, v. 10, n. 3, p. 727-733, May 2010.

1401 Tsai, W.T. *Human Health Risk on Environmental Exposure to Bisphenol-A: A Review.* *J*
1402 *Environ Sci Health.*, v. 24, n. 2, p. 225-255, Feb. 2006.

1403 U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA). *National Recommended Water*
1404 *Quality Criteria (2017).* Disponível em: [https://www.epa.gov/wqc/national-](https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table)
1405 [recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table.](https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table) Acessado em: 01 de Maio
1406 de 2018.

1407 Velicu, M., Suri, R. *Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of*
1408 *agricultural, suburban and mixed-use areas.* *Environ Monit Assess*, v. 154, n. 1-4, p.
1409 349-359, June 2009.

1410 Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R. *Identification of the pharmaceuticals for human*
1411 *use contaminating the Italian aquatic environment.* *J HazaDR Mater*, v. 122, n. 3, p. 205-
1412 209, July 2005.

1413 Yi, Y.J., Yang, Z.F., Zhang, S.H. *Ecological risk assessment of heavy metals in sediment*
1414 *and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower*
1415 *reaches of the Yangtze River basin.* *Environ Pollut.*, v. 159, n. 10, p. 2575-2585, Oct.
1416 2011.

1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427

1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461

O Artigo 2 intitulado: **Avaliação da influência do uso e cobertura do solo no potencial toxicogenético de águas superficiais da região centro-oeste do Brasil** será submetido a revista **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** (Qualis A2, Área interdisciplinar / Fator de Impacto: 2.467)

1462 **Avaliação da influência do uso e cobertura do solo no potencial toxicogenético de águas superficiais**
1463 **da região centro-oeste do Brasil**

1464

1465 Juliana Caroline Vivian Sposito^a, Luiza Flávia Veiga Francisco^a, Bruno do Amaral Crispim^b, Fabiana
1466 Gomes da Silva Dantas^b, Jéssica Pereira de Souza^a, Lucilene Finoto Viana^c, Julio César Jut Solórzano^c,
1467 Kelly Mari Pires de Oliveira^b, Alexeia Barufatti Grisolia^{b,*}

1468

1469 ^aFaculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD, Rua João
1470 Rosa Góes, Vila Progresso, 79.825-070 Dourados, MS, Brasil.

1471 ^bFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD, Rua
1472 João Rosa Góes, Vila Progresso, 79.825-070.

1473 ^cUniversidade Estadual de Mato Grosso do Sul - MS, Brasil.

1474 * Autor correspondente. E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br. Fone (+55) 67 3410-2256.

1475

1476 **Resumo**

1477 O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial toxicogenético de amostras de águas superficiais dos rios
1478 centro-oeste brasileiros e a influência do uso e cobertura do solo nos danos genéticos. As amostras foram
1479 coletadas em dois períodos, inverno (junho) e verão (novembro), em pontos amostrais dos rios Dourados e
1480 Brilhante (Mato Grosso do Sul / Brasil). As variáveis toxicogenéticas, incluindo alterações cromossômicas,
1481 micronúcleos e índice mitótico foram analisadas em células meristemáticas de *A. cepa*, por outro lado,
1482 micronúcleos, anormalidades nucleares e quebras no DNA (unidades arbitrárias, UA_T) foram analisadas
1483 em eritrócitos de *A. lacustris*. Além disso, os rios apresentaram valores físico-químicos fora das leis
1484 brasileiras, o que pode ser uma característica da poluição humana (esgoto doméstico e agricultura local).
1485 Os resultados do teste de *A. cepa* sugerem que as amostras de água dos rios Dourados e Brilhante exerceram
1486 efeitos citotóxicos e genotóxicos significativos ($p < 0,05$), em ambos os períodos de coleta, especialmente
1487 alterações no índice mitótico. Nas células sanguíneas de *A. lacustris*, também verificou-se efeito genotóxico
1488 das amostras de água dos rios, observado pela diferença significativa entre anormalidades nucleares,
1489 quebras no DNA (UA_T) em ambos os períodos de amostragem em relação ao controle negativo. Nos testes
1490 de *A. cepa* e *A. lacustris*, as frequências de micronúcleo não foram estatisticamente significativas. A análise
1491 de correlação de Pearson revelou que os dados de uso e cobertura do solo e parâmetros físico-químicos
1492 foram estatisticamente correlacionados com danos genéticos nos bioensaios realizados. Este estudo
1493 demonstrou o potencial toxicogenético das amostras de água dos rios Dourados e Brilhante, além disso, o
1494 tipo de uso e ocupação do solo e parâmetros físico-químicos revelaram ter influência sobre danos
1495 toxicogenéticos.

1496 **Palavras-chave:** Toxicologia aquática, danos genéticos, *Allium cepa*, *Astyanax lacustris*.

1497

1498 **1. Introdução**

1499 O tipo de cobertura do solo ao redor dos rios tem efeitos importantes na qualidade da água e é
1500 considerada uma ferramenta potencialmente informativa para análises da integridade dos ecossistemas
1501 aquáticos (Bua et al. 2014). As ações antropogênicas são consideradas as principais fontes de contaminação

1502 dos recursos hídricos por efluentes industriais, agrícolas e / ou domésticos. Em ambientes aquáticos, estes
1503 compostos favorecem a formação de misturas complexas que podem persistir no meio ambiente e podem
1504 causar danos ao DNA em organismos expostos (Lorente et al. 2015; Manzano et al. 2015). A complexidade
1505 dos poluentes em amostras ambientais exige testes simples, sensíveis e acessíveis (Tabrez et al. 2011).
1506 Nesse sentido, para avaliar os efeitos toxicogenéticos de misturas complexas de amostras de água do rio,
1507 testes com animais e plantas têm sido utilizados com frequência (Castro e Sousa et al. 2017; Matos et al.
1508 2017).

1509 Os peixes são frequentemente utilizados como indicadores biológicos da qualidade da água, e
1510 biomonitores para a presença de poluentes por bioacumulação de substâncias tóxicas, e são sensíveis a
1511 compostos antropogênicos. O peixe de água doce do gênero *Astyanax* tem sido utilizado em estudos de
1512 monitoramento ambiental como biomarcador para análise da contaminação dos recursos hídricos (Trujillo-
1513 Jiménez et al. 2011; Yamamoto et al. 2016). *Astyanax lacustris* popularmente conhecido como "lambari-
1514 do-rabo-amarelo", da família Characidae, é uma das espécies de peixes mais abundantes e apresenta uma
1515 ampla distribuição em praticamente todas as bacias hidrográficas do Brasil (Súarez et al. 2011). Além disso,
1516 da Rocha et al. (2018) observaram alterações no DNA em eritrócitos de *A. lacustris*, expostos a amostras
1517 de água do córrego Curral de Arame (MS), relacionando a sensibilidade do organismo como bioindicador.

1518 As plantas também são consideradas excelentes sistemas biológicos, pois são bons bioindicadores
1519 de toxicidade, com alta sensibilidade para detectar agentes citotóxicos e genotóxicos através de diferentes
1520 mecanismos genéticos, incluindo micronúcleos e alterações cromossômicas (Leme e Marin-Morales 2009).
1521 A *Allium cepa* ($2n = 16$) é um dos melhores sistemas para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e é
1522 amplamente utilizado no monitoramento do efeito de poluentes presentes em ambientes aquáticos (Düsman
1523 et al. 2014; Matos et al. 2017).

1524 A Bacia do Alto Rio Paraná fornece água para a região mais densamente povoada do Brasil. O
1525 trecho do Alto Rio Paraná no Estado do Mato Grosso do Sul, onde estão localizados os rios Dourados e
1526 Brilhante, flui por regiões com menor densidade populacional que os Estados de São Paulo e Paraná. No
1527 entanto, uma forte atividade agrícola e a ausência de tratamento adequado de esgoto em cidades ribeirinhas
1528 pode levar os poluentes para dentro dos rios, impactando negativamente a biota aquática (Message et al.
1529 2016).

1530 Estudos demonstram que a integridade dos rios pode ser avaliada regularmente por parâmetros
1531 físico-químicos. No entanto, considerando o potencial efeito da água superficial sobre os organismos
1532 (Batista et al. 2016), a influência das atividades antrópicas devido o tipo de uso do solo em rios centro-
1533 oeste brasileiros, estudos biológicos são importantes para complementar esses parâmetros. Neste sentido,
1534 o trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico-genético de amostras de águas superficiais dos rios
1535 Dourados e Brilhante (Mato Grosso do Sul / Brasil) utilizando bioensaios com animais e plantas e verificar
1536 a influência do uso e cobertura do solo nos danos genéticos.

1537

1538 **2. Material e métodos**

1539 **2.1 Área de estudo e amostragem**

1540 Os rios Dourados e Brilhante (DR e BR, respectivamente) estão localizados na Bacia do Alto Rio
1541 Paraná, região sul do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. O DR e o BR, com uma extensão de 370 km

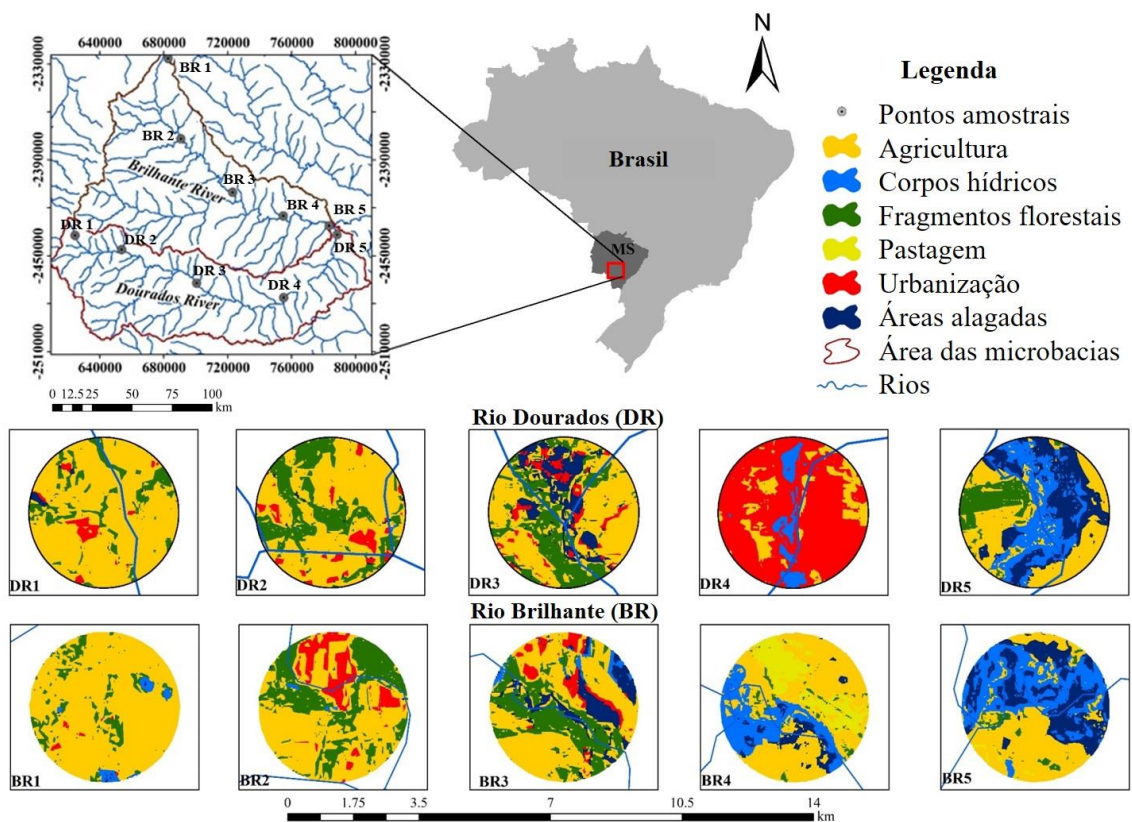
1542 e 344 km, respectivamente, são considerados importantes rios no fornecimento de água para vários
 1543 municípios (Ferreira e Silva, 2015). Além disso, o DR fornece água para a cidade de Dourados, que
 1544 corresponde a segunda maior cidade do Estado, com 218 mil habitantes (IBGE 2017). Os rios têm sido
 1545 afetados por atividades antrópicas como urbanização, agricultura e consequente redução da vegetação no
 1546 entorno dos rios, comprometendo a qualidade da água devido ao descarte de efluentes. Amostras de águas
 1547 superficiais foram coletadas no DR e BR no período do inverno (junho) e verão (novembro) de 2015, em
 1548 cinco locais ao longo de cada rio, totalizando dez pontos de amostragem, selecionados na direção da
 1549 nascente até a foz do rio. A seleção dos pontos está associada às características dos rios e às diferentes
 1550 atividades desenvolvidas próximas aos locais de amostragem.

1551

1552 **2.2 Mapa de uso e cobertura do solo**

1553 O mapeamento do uso e cobertura do solo nos pontos de amostragem foi realizado usando imagens
 1554 aéreas de alta resolução obtidas do Google Earth Pro®, com tamanho de pixel (célula) de 1 m. Para o limite
 1555 do estudo, foram gerados buffers de 1,5 km de raio em cada local de amostragem (10 locais) e os tipos de
 1556 uso da terra foram classificados como agricultura, corpos d'água, fragmentos florestais, pastagens,
 1557 urbanização e áreas úmidas. Para a interpretação das imagens, utilizou-se classificação visual utilizando as
 1558 ferramentas de escaneamento fornecidas pelo programa ArcGIS® 10.4 em sua versão de teste (ESRI, 2015),
 1559 calculando as áreas e porcentagens de cada categoria de cobertura do solo (Fig. 1).

1560



1561

1562 **Fig 1.** Cobertura do solo e localização dos pontos de amostragem nos rios Dourados e Brilhante (Mato
 1563 Grosso do Sul / Brasil).

1564

1565 **2.3 Determinação dos parâmetros físico-químicos das amostras de água**

1566 Durante a coleta, dados de condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$), potencial hidrogeniônico (pH),
1567 oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foram determinados utilizando sonda multiparâmetro YSI
1568 Professional Plus.

1569

1570 **2.4 Teste de *Allium cepa***

1571 O teste de *A. cepa* foi conduzido de acordo com Fiskesjo (1985) e Ma et al. (1995), com algumas
1572 modificações. Sementes de *A. cepa* foram expostas a amostras de água coletadas em recipientes de vidro
1573 esterilizados de 1 L em cada local de amostragem e germinadas a 25°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 96 h. O controle
1574 negativo (MiliQ Water) foi submetido às mesmas condições. Após o período de exposição, as raízes foram
1575 fixadas em solução de Carnoy 3: 1 (etanol-ácido acético) por 24 h. Após a fixação, as raízes foram lavadas
1576 com água destilada e hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 min e coradas com Reativo de Schiff por 2 h.
1577 Para a preparação das lâminas, as raízes foram lavadas em água destilada e, em seguida, a região
1578 meristemática das raízes foi macerada e corada com solução Carmim acético a 2%. Dez lâminas foram
1579 preparadas para cada tratamento e 500 células foram contadas por lâmina (totalizando 5000 células por
1580 pontos de amostragem). Alterações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM) foram
1581 analisadas em microscópio óptico de luz com aumento de 400X.

1582

1583 **2.5 Testes com *Astyanax lacustris***

1584 Cinco indivíduos jovens de *A. lacustris*, obtidos de um distribuidor local e aproximadamente do
1585 mesmo tamanho (10 cm), foram mantidos em tanques de vidro (contendo 20 L de água proveniente dos
1586 pontos de amostragem) sob aeração constante e ciclo claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura de 23°C
1587 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) por um período de exposição de 72 horas. O controle negativo (CN) (Água mineral comercial) foi
1588 submetido as mesmas condições. O experimento foi realizado com aprovação do Comitê de Ética em
1589 Pesquisa Animal (Parecer nº 10/2015) da Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD, e todos os
1590 procedimentos realizados envolvendo os animais estavam de acordo com os padrões éticos da instituição.

1591

1592 **2.5.1 Teste de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN)**

1593 As amostras de sangue foram coletadas da região caudal e preparadas duas lâminas por indivíduo.
1594 As lâminas foram secas a temperatura ambiente por 15 min, fixadas em álcool absoluto por 10 min e coradas
1595 com Reativo de Schiff por 2h e contra-coradas com Fast Green por 10 segundos. Para cada ponto amostral,
1596 dez mil células foram analisadas. A frequência de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares (AN)
1597 (blebbed, lobed, notched e células binucleadas) foram analisadas em microscópio óptico de luz Nikon, com
1598 aumento de 400X.

1599

1600 **2.5.2 Ensaio do Cometa**

1601 A eletroforese em gel de célula única (EGCU)/Ensaio do Cometa foi realizado de acordo com
1602 Singh et al. (1988) com modificações. O sangue foi coletado por punção branquial e preparado uma
1603 suspensão de células, diluindo $6\ \mu\text{L}$ de sangue em $95\ \mu\text{L}$ de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) em
1604 $2000\ \mu\text{L}$ de solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,4) (37°C). As lâminas foram previamente

1605 revestidas com 1,5% de agarose normal. A suspensão celular foi aplicada nas lâminas e uma lamínula foi
1606 colocada em cada lâmina, a qual foi acondicionada a 4 °C por 15 min para solidificar a agarose. A lamínula
1607 foi removida e as lâminas foram incubadas em solução de lise a 4 °C por 1 h, no escuro, a fim de expor o
1608 DNA nuclear à eletroforese. As lâminas foram incubadas em solução de eletroforese alcalina (NaOH 10N
1609 e EDTA 200mM, pH> 13) por 20 minutos e submetidas à eletroforese a 300 mA e 37 V por 25 min. Após
1610 a etapa de neutralização (5N Tris-HCl pH 7,5), as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 min e
1611 coradas com 50 µL de brometo de etídio. Duas lâminas foram preparadas para cada peixe e um total de 50
1612 células foram analisadas por lâmina, totalizando 500 células por ponto. As lâminas foram analisadas em
1613 microscópio de fluorescência (400X Nikon) por apenas um observador. Os nucleóides foram classificados
1614 em quatro classes distintas: classe 0 (material genético sem dano ou intacto); classe 1 (dano leve), classe 2
1615 (dano moderado), classe 3 (dano severo) e classe 4 (dano máximo). A quantidade total de quebras do DNA
1616 foi expressa em unidades arbitrárias totais (UA_T) definidas como: $AU_T = N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times$
1617 $3 + N_4 \times 4$, onde N_i é o número de células contadas com seus respectivos danos (Collins 2002).

1618

1619 **2.6 Análises estatísticas**

1620 Como os danos na *A. cepa* (alterações cromossômicas, micronúcleos e índice mitótico) não
1621 tiveram distribuição normal, os dados de *A. cepa* foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de
1622 Mann-Whitney, já os dados de *A. lacustris* (micronúcleos, anormalidades nucleares e unidades arbitrárias)
1623 tiveram distribuição normal e foram submetidos ao teste t. Os períodos foram analisados por meio do teste
1624 Kruskal-Wallis, com nível de significância de $p \leq 0,05$. Todos os pontos foram comparados com o controle.
1625 As análises foram realizadas utilizando a plataforma R (R Development Core Team, 2016). A análise de
1626 correlação entre danos no DNA em *A. cepa* e *A. lacustris*, parâmetros físico-químicos e dados de uso e
1627 cobertura do solo foram analisados utilizando coeficientes de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$), realizados
1628 no programa Past versão 3.20.

1629

1630 **3. Resultados**

1631 **3.1 Uso e cobertura do solo**

1632 Em geral, o mapeamento de uso e cobertura do solo mostra que a agricultura é amplamente
1633 distribuída pela bacia, concentrando-se principalmente nos pontos 1, próximos as nascentes, variando de
1634 82,5 a 86,2% nos rios DR e BR, respectivamente. Os pontos 1, 2 e 3 do DR e os locais 1, 2, 3 e 4 da BR,
1635 são ocupados predominantemente pela atividade agrícola, no entanto, o ponto 4 do DR é ocupado em 77,0%
1636 pela atividade urbana. Além disso, embora a maior parte do solo seja ocupada por agricultura e urbanização,
1637 em alguns pontos também foi verificado um percentual considerável de corpos d'água e áreas úmidas, como
1638 apresentado nos pontos 5 do DR e BR (Tabela 1).

1639

1640

1641

1642

1643

1644 **Tabela 1** Dados (%) de uso e cobertura do solo nos pontos de amostragem dos rios Dourados e
 1645 Brilhante.

Rios	Pontos	Agricultura	Pastagem	Urbanização	Fragmentos florestais	Corpos hídricos	Áreas alagadas
Rio Dourados (DR)	DR1	82.5	0	3.5	12.8	0	1.0
	DR2	64.4	0	6.4	28.1	0.1	0.6
	DR3	51.2	0	7.2	24.7	0	16.4
	DR4	14.7	0	77.0	0	7.7	0
	DR5	33.4	0.3	0	12.3	26.0	27.3
Rio Brilhante (BR)	BR1	86.2	0	0.6	10.1	2.5	0.2
	BR2	56.7	0	12.6	29.6	0.6	0.1
	BR3	49.1	0	7.0	27.0	3.0	13.3
	BR4	53.0	17.1	0	3.0	20.1	6.4
	BR5	36.4	1.2	0	2.9	30.8	28.0

1646

1647 Os conflitos de uso e cobertura da terra são determinados pelos usos inadequados do solo, como é
 1648 o caso da ocupação do solo dentro de áreas de preservação permanente (APPs). As APPs são fundamentais
 1649 dentro de uma bacia hidrográfica, e são caracterizadas por matas ciliares responsáveis por todo o processo
 1650 de conservação e manutenção dos recursos hídricos. A preservação da vegetação nas nascentes é
 1651 fundamental para a qualidade da água, porém devido à expansão das atividades antrópicas é freqüente a sua
 1652 degradação, principalmente devido à atividade agrícola. Embora os locais de amostragem sejam cobertos
 1653 por vegetação, alguns locais têm a cobertura florestal reduzida como nos pontos 4 e 5, variando de 3,0 a
 1654 2,9%, no BR ou nenhum tipo de cobertura devido ao desmatamento, como mostrado no DR4.

1655

1656 3.2 Análise físico-química da água

1657 Parâmetros físico-químicos obtidos para amostras de água dos rios Dourados e Brilhante,
 1658 coletados nos períodos de inverno e verão, são apresentados na Tabela 2.

1659

1660 **Tabela 2** Parâmetros físico-químicos como oxigênio dissolvido (OD), potencial hidrogeniônico (pH),
 1661 condutividade elétrica (Cond.) e temperatura (Temp.) dos pontos de amostragem dos rios Dourados e
 1662 Brilhante.

	Pontos	Dourados (DR)				Brilhante (BR)			
		^a OD (mg L ⁻¹)	^a pH	^b Cond. (µS cm ⁻¹)	Temp. (°C)	^a OD (mg L ⁻¹)	^a pH	^b Cond. (µS cm ⁻¹)	Temp. (°C)
Inverno	1	9.95	10.12	23.2	18.8	10.71	5.23	18.4	16.0
	2	9.88	10.04	46.3	18.0	10.68	6.00	50.4	18.1
	3	10.8	9.70	44	18.7	10.98	5.95	44.1	18.6
	4	9.76	5.90	95.7	18.5	11.05	5.84	45.1	19.1
	5	9.84	5.92	46.3	19.2	8.66	5.66	49.6	19.6
Verão	1	6.53	6.31	21.3	22.6	3.66	7.33	26.6	30.1
	2	6.16	6.05	39.7	24.1	4.29	7.40	48.4	30.1
	3	6.01	7.55	44.5	25.5	4.15	7.26	45.2	29.4
	4	4.86	6.07	51.5	25.1	4.33	7.10	44.5	28.5
	5	4.29	6.5	53.2	26.0	8.96	7.04	61	27.1
Padrões		≤ 100 µS		Não estabelecido		≤ 100 µS		Não estabelecido	
		>5 mg L ⁻¹ 6.0 to 9.0				>5 mg L ⁻¹ 6.0 to 9.0			

1663 Valor máximo permitido pela ^(a) legislação brasileira (Resolução 357/2005) do Conselho Nacional do Meio
 1664 Ambiente (Conama, 2005) e ^(b) Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB 2005).
 1665 Valores em negrito estão em desacordo com os padrões estabelecidos.

1666

1667 Os resultados do oxigênio dissolvido (OD) indicam concentrações de 9,76 a 10,8 mg L⁻¹ e de 4,29
 1668 a 6,53 mg L⁻¹ em amostras de água nos período de inverno e verão, respectivamente. No BR, foram
 1669 observadas concentrações de 8,66 a 11,05 mg L⁻¹ no inverno e de 3,66 a 8,96 mg L⁻¹ no verão. Em ambos
 1670 os rios, no verão foram observados valores abaixo do limite de 5,0 mg L⁻¹ conforme estabelecido pela
 1671 legislação brasileira (Resolução 357/2005) para Classe 2 (destinados ao consumo humano após o
 1672 tratamento, agricultura, recreação e atividade pesqueira) (Conama 2005).

1673 Variações também foram observadas para o pH durante o inverno de 5,90 e 10,12 no DR e 5,23 a
 1674 6,00 no BR. No entanto, no verão todos os valores estavam de acordo com a resolução brasileira. Para
 1675 condutividade elétrica foram observados valores abaixo do limite estabelecido de 100 µS cm⁻¹. No entanto,
 1676 alta condutividade elétrica, 95,7 µS cm⁻¹, foi observada no ponto 4 do DR no inverno. Em relação à
 1677 temperatura, não há valor estabelecido na legislação brasileira. No entanto, foram observadas variações de
 1678 acordo com as estações do ano, menor temperatura no inverno e maior no verão.

1679

1680 3.3 Teste de *Allium cepa*

1681 A análise celular das raízes de *A. cepa* expostas as águas coletadas no DR mostrou indução de AC,
 1682 em pelo menos um dos locais estudados, e alterações no IM durante os períodos de coleta e em todos os
 1683 pontos de amostragem, exceto 1 e 5 (Inverno) e ponto 5 (Verão). Amostras de água do BR também
 1684 induziram AC durante o verão e alterações na divisão celular, IM, em todos os pontos de amostragem, com
 1685 exceção dos pontos 1 e 5 no inverno e verão, respectivamente. Os resultados de MN não foram
 1686 estatisticamente significativos (p <0,05) em nenhum dos rios quando comparado ao CN (Tabela 3).

1687

1688 **Tabela 3** Alterações cromossômicas (AC), micronúcleo (MN) e índice mitótico (IM) (média ± desvio
 1689 padrão) em células de *A. cepa*, nos pontos de amostragem dos rios Dourados e Brilhante, durante os
 1690 períodos de coleta.

	Pontos Inverno	Rio Dourados (DR)			Rio Brilhante (BR)		
		AC	MN	IM	AC	MN	IM
Inverno	1	0.60 ± 0.62	0.09 ± 0.24	51.70 ± 19.69	0.25 ± 0.33	0.01 ± 0.06	45.92 ± 40.24
	2	0.90 ± 0.71	0.03 ± 0.08	64.73 ± 9.28 *	1.14 ± 0.71	0.03 ± 0.08	62.62 ± 24.50 *
	3	1.36 ± 0.62 *	0.02 ± 0.06	66.38 ± 8.41 *	0.40 ± 0.47	0.0 ± 0.0	74.42 ± 6.35 *
	4	1.25 ± 0.64	0.0 ± 0.0	56.69 ± 6.67 *	1.07 ± 0.62	0.01 ± 0.06	65.01 ± 7.69 *
	5	0.80 ± 0.76	0.04 ± 0.09	53.35 ± 9.73	1.18 ± 0.75	0.0 ± 0.0	65.37 ± 5.30 *
Verão	1	0.93 ± 0.53	0.0 ± 0.0	71.56 ± 8.99 *	0.43 ± 0.57	0.09 ± 0.12	57.14 ± 12.03*
	2	1.60 ± 1.05 *	0.10 ± 0.19	71.05 ± 6.56 *	1.47 ± 1.11 *	0.0 ± 0.0	56.63 ± 9.04 *
	3	1.34 ± 1.09 *	0.11 ± 0.18	71.19 ± 6.72 *	1.42 ± 0.83 *	0.0 ± 0.0	69.09 ± 9.36 *
	4	0.69 ± 0.68	0.0 ± 0.0	60.55 ± 13.50 *	0.76 ± 0.64	0.03 ± 0.08	61.04 ± 9.45 *
	5	1.08 ± 0.34	0.11 ± 0.10	48.53 ± 10.27	0.86 ± 0.65	0.04 ± 0.08	53.89 ± 12.06
	CN	0.51 ± 0.34	0.0 ± 0.0	44.68 ± 7.27	0.51 ± 0.34	0.0 ± 0.0	44.68 ± 7.27

1691 O *asterisco* indica que os resultados são estatisticamente significativos quando comparados ao controle
 1692 negativo (CN) pelo teste de Mann-Whitney (p < 0.05).

1693

1694 3.4 Teste com *Astyanax lacustris*

1695 Em células sanguíneas de *A. lacustris*, as frequências de MN não foram significativas em nenhum
 1696 rio e período de coleta quando comparado ao CN. Por outro lado, amostras de água do DR e BR
 1697 apresentaram potencial genotóxico para AN e UA_T durante os períodos de inverno e o verão, em todos os
 1698 pontos de amostragem, nascente a foz, quando comparadas com a CN, com exceção para NA no ponto 1
 1699 do DR (Verão) e ponto 2 do BR (Inverno), como apresentado na Tabela 4.

1700 **Tabela 4** Micronúcleo (MN), anormalidades nucleares (AN) e unidades arbitrárias (UA_T) (média ± desvio
1701 padrão) de eritrócitos de *A. lacustris*, nos rios Dourados e Brilhante, durante os períodos de coleta.

Pontos Inverno	Rio Dourados (DR)			Rio Brilhante (BR)		
	MN	AN	UA _T	MN	AN	UA _T
1	0.12 ± 0.25	3.29 ± 1.31 *	183 ± 67.81 *	0.25 ± 0.5	1.66 ± 0.97 *	302 ± 23.25 *
2	0.12 ± 0.25	1.70 ± 1.05 *	239.5 ± 67.15 *	0.0 ± 0.0	1.11 ± 0.61	277.5 ± 51.52 *
3	0.05 ± 0.08	3.98 ± 1.58 *	190.5 ± 34.39 *	0.37 ± 0.75	4.40 ± 2.17 *	281.4 ± 62.47 *
4	0.05 ± 0.08	7.25 ± 3.83 *	248.4 ± 61.45 *	0.16 ± 0.28	5.66 ± 4.53 *	278.6 ± 10.01 *
5	0.10 ± 0.22	12.45 ± 4.91 *	243.2 ± 21.98 *	0.0 ± 0.0	3.72 ± 2.11 *	258 ± 39.85 *
Verão						
1	0.12 ± 0.25	1.37 ± 0.43	128.7 ± 42.86 *	0.12 ± 0.25	2.02 ± 1.51 *	208.7 ± 73.57 *
2	0.05 ± 0.08	1.76 ± 0.60 *	138 ± 50.77 *	0.0 ± 0.0	3.1 ± 1.55 *	292.6 ± 32.18 *
3	0.10 ± 0.22	1.81 ± 0.88 *	181 ± 51.60 *	0.0 ± 0.0	2.38 ± 1.84 *	313.2 ± 56.21 *
4	0.25 ± 0.28	2.32 ± 1.39 *	73 ± 37.08 *	0.0 ± 0.0	2.67 ± 0.66 *	308.7 ± 30.59 *
5	0.12 ± 0.25	5.54 ± 2.72 *	76.2 ± 62.99 *	0.37 ± 0.47	2.68 ± 1.32 *	84 ± 42.43 *
CN	0.05 ± 0.08	0.75 ± 0.69	11.2 ± 4.14	0.05 ± 0.08	0.75 ± 0.69	11.2 ± 4.14

1702 O asterisco indica que os resultados são estatisticamente significativos quando comparados ao controle
1703 negativo (CN) pelo teste t (p < 0.05).

1704

1705 3.5 Período de coleta

1706 Em relação aos períodos de coleta, inverno e verão, os resultados de *A. cepa* não mostraram
1707 diferença significativa para AC e MN em nenhum dos rios, quando comparado com a CN. No entanto, para
1708 ambos os rios, o IM foi estatisticamente significativo entre os períodos de amostragem e em relação ao CN,
1709 com nível de significância de p ≤ 0,05.

1710 Nos eritrócitos de *A. lacustris*, não foi verificado diferença significativa na frequência de MN entre
1711 os períodos. No entanto, para AN, observou-se diferença significativa entre ambos os períodos de coleta e o
1712 CN, exceto para o DR no verão (Novembro). Durante os períodos, também encontramos potencial
1713 genotóxico (AU_T) da água entre os períodos de coleta e em relação ao controle para ambos os rios, DR e
1714 BR.

1715

1716 3.6 Análise de correlação

1717 A análise de correlação de Pearson revelou que os dados de uso e cobertura do solo e parâmetros
1718 físico-químicos foram estatisticamente correlacionados com danos genéticos observados nos bioensaios de
1719 *Allium cepa* e *Astyanax lacustris*. No DR, para os dados de uso e cobertura do solo verificou-se correlação
1720 negativa entre pastagem e IM, porém positiva com AN (*A. cepa*). Corpos hídricos foram negativamente
1721 correlacionados com IM e positivamente com AN. Parâmetros físico-químicos como OD foi correlacionado
1722 com UA_T (*A. lacustris*), por outro lado, temperatura e UA_T foram correlacionados negativamente. No BR
1723 foi verificado somente uma correlação positiva entre os dados de condutividade e AC (*A. cepa*), como
1724 observado na Tabela 5.

1725

1726

1727

1728

1729

1730 **Tabela 5** Análise de correlação de Pearson (r^2) entre dados de uso e cobertura do solo (agricultura,
 1731 pastagens, fragmentos florestais, urbanização, corpos d'água e áreas alagadas), parâmetros físico-químicos
 1732 (oxigênio dissolvido (DO), potencial hidrogeniônico (pH), condutividade e temperatura) e danos genéticos
 1733 como alterações cromossômicas (AC), micronúcleos (MN) e índice mitótico (MI) em *A. cepa*; micronúcleo
 1734 (MN), anormalidades nucleares (NA) e unidades arbitrárias (UA_T , ensaio cometa) em *A. lacustris* expostos
 1735 à amostras de água proveniente dos rios Dourados e Brilhante.

Parâmetros	Rio Dourados						Rio Brilhante					
	<i>Allium cepa</i>			<i>Astyanax lacustris</i>			<i>Allium cepa</i>			<i>Astyanax lacustris</i>		
	AC	MN	IM	MN	AN	UA_T	AC	MN	IM	MN	AN	UA_T
Agricultura	-0,03	0,28	0,39	-0,12	-0,50	0,04	-0,56	0,25	-0,53	0,04	-0,43	0,23
Pastagem	-0,18	0,28	-0,64	0,11	0,73	-0,08	0,03	-0,02	0,11	-0,13	0,49	0,20
Urbanização	-0,09	-0,56	-0,11	0,19	0,03	-0,06	0,47	-0,43	0,25	-0,36	-0,25	0,34
Frag. florestais	0,49	0,45	0,54	-0,39	-0,37	0,19	0,30	-0,47	0,33	-0,25	-0,25	0,39
Corpos hídricos	-0,23	0,12	-0,72	0,18	0,78	-0,10	0,12	0,26	-0,00	0,16	0,39	-0,50
Áreas alagadas	0,09	0,36	-0,37	-0,05	0,58	-0,00	0,16	0,05	0,27	0,27	0,31	-0,52
OD	-0,10	-0,31	-0,12	-0,45	0,35	0,86	-0,27	-0,24	0,05	0,52	0,28	-0,08
pH	-0,17	0,16	0,02	-0,06	-0,33	0,32	0,32	0,25	-0,00	-0,25	-0,20	-0,24
Condutividade	0,28	-0,27	-0,28	-0,28	0,41	0,30	0,64	-0,10	0,40	-0,07	0,27	-0,37
Temperatura	0,21	0,40	0,18	0,37	-0,34	-0,82	0,31	0,27	-0,06	-0,28	-0,18	-0,21

1736 Correlações significativas estão indicadas em negrito.

1737

1738 4 Discussão

1739 A avaliação físico-química das amostras de água dos rios Dourados e Brilhante demonstrou uma
 1740 deterioração do ambiente aquático, provavelmente devido à presença de efluentes liberados pela ação
 1741 humana. Variáveis físico-químicas com valores fora da faixa aceitável quando comparadas com a
 1742 Resolução Brasileira (CONAMA, 2005) são essenciais para estudos de caracterização e qualidade da água.

1743 Em nosso estudo, o valor de oxigênio dissolvido (OD) foi encontrado dentro do intervalo aceitável
 1744 no inverno, porém, no verão, os pontos 4 e 5 do DR e 1, 2, 3 e 4 do BR apresentaram valores fora das
 1745 legislação brasileira ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$). Segundo Dusman et al. (2014), os baixos níveis de O_2 dissolvido podem
 1746 ser devidos à liberação de matéria orgânica e efluentes no rio, devido atividades agrícolas ou urbanas, bem
 1747 como redução das matas ciliares. A vegetação ripária representa uma defesa crítica dos recursos hídricos
 1748 contra perturbações ambientais. As matas ciliares são capazes de estabilizar a temperatura e o OD dos rios
 1749 (Houghton e Wasson 2013).

1750 Por outro lado, para o pH foram observados valores dentro e fora da faixa aceitável pela Resolução
 1751 Brasileira (6,0 a 9,0) durante o inverno, para ambos os rios. No DR, considerando a forte influência da
 1752 urbanização no ponto 4 (77,0%), nenhum tipo de cobertura vegetal, como observado na Tabela 1, e
 1753 consequente descarte de efluentes domésticos com ausência de tratamento adequado de esgoto pode ser
 1754 responsável pelo aumento da proliferação de algas que em processo de decomposição reduz o pH da água
 1755 (Marotta et al. 2008), como observado nos pontos 4 e 5 do DR.

1756 No Brasil, é comum a aplicação de gesso e calcário ao solo, visando reduzir a acidez no perfil do
 1757 solo com altos níveis de alumínio (Sousa e Lobato 2004; Caires et al. 2008), garantindo assim maior
 1758 produtividade (Zandoná et al. 2015). Desta forma, a intensa atividade agrícola, pode estar associada ao
 1759 aumento da alcalinidade da água (Tabela 2), devido ao escoamento superficial de gesso e calcário para
 1760 dentro do rio. Além disso, atividades agrícolas alteram as propriedades físico-químicas da água com a

1761 aplicação de fertilizantes e outras substâncias químicas, sendo responsáveis pela variação na temperatura
1762 da água, oxigênio dissolvido (Helms et al. 2009) e pH (Zampella 2007).

1763 Apesar da condutividade elétrica estar de acordo com o limite estabelecido pela Companhia
1764 Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), foi observada alta condutividade elétrica no ponto 4 (95,7
1765 $\mu\text{S cm}^{-1}$) no DR durante o inverno, quando comparada a outros locais de amostragem, o que pode ser
1766 atribuída a presença de materiais dissolvidos (Marinelli et al. 2000) devido à intensa atividade urbana e
1767 nenhum tipo de cobertura vegetal ao redor do ponto (Tabela 1). Valores de condutividade elétrica maiores
1768 que $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ têm um impacto negativo no ambiente (CETESB 2005). Entretanto, embora os parâmetros
1769 físico-químicos determinem a composição da água, esses dados não são suficientes para prever os riscos
1770 aos quais a biota nativa está sujeita. A inespecificidade ocorre porque os organismos vivos reagem aos
1771 poluentes de maneira integrada a outros fatores ambientais, desta forma os parâmetros biológicos devem
1772 complementar tais análises.

1773 *Allium cepa* é um organismo bioindicador amplamente utilizado no monitoramento da toxicidade
1774 ambiental (Matos et al., 2017). Neste estudo, frequências significativas de AC foram observadas para
1775 amostras de água de ambos os rios, porém frequências de MN não foram significativas quando comparado
1776 ao CN. Radic et al. (2010) também encontraram alterações cromossômicas induzidas com águas
1777 superficiais da cidade de Zagreb, na Croácia, poluídas por uma ampla gama de fontes, quando comparadas
1778 com o controle negativo. Por outro lado, Bianchi et al. (2011), também relataram que os resultados de
1779 micronúcleos do teste de *A. cepa* não diferiram entre o controle negativo e amostras de água coletadas em
1780 seis locais diferentes do rio Monjolinho, São Paulo, Brasil.

1781 O potencial citotóxico foi determinado pelo índice mitótico, IM. Os resultados mostraram
1782 alterações significativas, nas células das raízes de *A. cepa* expostas as amostras de água de todos os pontos
1783 amostrais dos rios, com algumas exceções. Considerando que esta região possui muitos campos agrícolas
1784 (Tabela 1), a agricultura pode ser responsável por causar alterações na água, devido à presença de
1785 contaminantes (agroquímicos) e consequente redução da cobertura florestal (Dusman et al. 2014). A
1786 vegetação ripária representa uma defesa dos recursos hídricos porque evita o escoamento superficial e
1787 estimula a infiltração (Houghton e Wasson, 2013). Assim, altas frequências de IM, podem indicar a
1788 presença de substâncias com capacidade mitogênica, causando um aumento na taxa de divisão celular, o
1789 que pode levar à proliferação celular descontrolada, como observado por Leme e Marin-Morales (2009).

1790 Os dados deste estudo corroboram com o estudo de Radić et al. (2010) mostrando a atividade
1791 mitótica de amostras de água coletadas perto de uma fábrica de fertilizantes artificiais da bacia do rio Llova
1792 (Croácia) devido a efeitos estimulatórios temporários do nitrato, nitrito, amônio e fosfato sobre a
1793 proliferação de células na raiz de *A. cepa*. Segundo Vujosevic et al. (2008), os testes de citotoxicidade
1794 podem indicar claramente a localização das fontes de poluentes nos rios. Os pontos que não apresentaram
1795 potencial citotóxico quando comparados ao controle podem ser atribuídos à capacidade autodepurativa na
1796 foz dos rios como observado por Bianchi, Espindola e Marin-Morales (2011), assim como devido a
1797 presença de corpos d'água nos pontos 5 do DR e BR, 26,0% e 30,8%, respectivamente. Corroborando com
1798 resultados da análise de correlação de Pearson, sendo verificado, dentre outros aspectos, uma correlação
1799 inversamente proporcional (Tabela 5) entre as variáveis, corpos hídricos e IM.

1800 O teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes é amplamente utilizado e recomendado para
1801 estudos de poluentes ambientais (Udroiu 2006). Entretanto, neste estudo não foram observadas frequências
1802 significativas para MN em *A. lacustris* nos diferentes períodos de coleta e em ambos os rios. Resultados
1803 semelhantes foram observados por Grisolia e Starling (2001), que não observaram diferenças significativas
1804 nas frequências de MN entre pontos de amostragem próximos a áreas hipertróficas do lago Paranoá e o
1805 controle. Barbosa et al. (2010) também não observaram mudanças significativas na frequência de MN nos
1806 eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Por outro lado, da Rocha et al. (2018) relataram alto número de MN
1807 em eritrócitos de *A. lacustris*, relacionando a existência de agentes genotóxicos nas amostras de água do
1808 DR. A não similaridade deste estudo com os resultados de da Rocha et al. (2018) para MN, pode ser
1809 atribuído aos diferentes pontos de amostragem e período de coleta.

1810 Neste estudo, foi observado uma indução significativa para AN em peixes expostos a amostras de
1811 água dos rios. Ghisi et al. (2014) mostraram que as frequências de AN em peixes capturados em áreas
1812 poluídas por diferentes tipos de efluentes foram significativamente maiores do que os peixes coletados em
1813 uma área controle. Além disso, eles também encontraram maiores alterações em peixes localizados
1814 próximos a foz do rio, como observado neste estudo. Alguns estudos tentaram associar as diferentes AN
1815 nos peixes com poluentes específicos. No entanto, segundo Carrasco et al. (1990) é difícil associar
1816 diferentes tipos de anormalidades a uma fonte específica de poluição.

1817 O Ensaio Cometa é uma ferramenta amplamente utilizada para detectar genotoxicidade em
1818 ambientes aquáticos (Frenzilli et al. 2008). Neste estudo, quebras no DNA (AU_T) foram observadas em
1819 todas as amostras de água coletadas ao longo dos rios, nascente a foz. Considerando a influência urbana e
1820 principalmente agrícola ao longo de todo o curso dos rios, frequências significativas de AU_T podem estar
1821 associadas à presença de agroquímicos. Segundo Scorza Júnior e Silva (2006) entre os agroquímicos mais
1822 populares na região do DR estão o glifosato (14,8%), 2,4-D (5,6%), fipronil (5,4%), metamidofós (5,2%) e
1823 outros. Os potenciais efeitos genotóxicos em peixes, por glifosato (Çavas e Konem 2007), 2,4-D (Arcaute,
1824 Soloneski e Larramendy 2016), fipronil (Ghisi et al. 2011) foram relatados, mostrando danos significativos
1825 no DNA após exposição.

1826 Moléculas de agrotóxicos ou seus metabólitos são tipicamente compostos eletrofílicos reativos,
1827 que, como outros agentes xenobióticos, são capazes de se ligar covalentemente as bases dos ácidos
1828 nucleicos, resultando na formação de adutos de DNA. A geração de tais adutos é um evento significativo
1829 na progressão da carcinogênese e mutagênese (Boerth et al. 2008). Além disso, danos ao DNA e / ou seus
1830 componentes estruturais (bases nitrogenadas, nucleosídeos e nucleotídeos) resultantes da aplicação de
1831 moléculas de agrotóxicos ou seus metabólitos podem dificultar processos de transcrição, replicação,
1832 resultando em parada do ciclo celular, morte celular e mutações (Bolognesi et al. 2011).

1833 Neste estudo, não foram observadas relações entre frequências de micronúcleos e ensaio cometa.
1834 Resultado semelhante também foi observado por Barbosa et al. (2010), que também observaram um
1835 aumento na quantidade de quebras da cadeia de DNA, pelo ensaio cometa, em eritrócitos *O. niloticus*, mas
1836 nenhuma alteração na frequência de micronúcleos. Esses resultados podem ser atribuídos ao aumento na
1837 capacidade de reparo do DNA que pode ter ocorrido, resultando na quebra do DNA não sendo convertido
1838 em micronúcleos. Esta observação também pode ser explicada devido à natureza dos poluentes e diferenças

1839 na sensibilidade dos testes utilizados. Além disso, este estudo sugere que o ensaio cometa é mais sensível
1840 que outros testes de genotoxicidade (Frenzilli et al. 2008; Barbosa et al. 2010).

1841

1842 **5 Conclusão**

1843 Este estudo demonstra o potencial toxicogenético das águas dos rios Dourados e Brillante nos
1844 ensaios de *A. cepa* e *A. lacustris*. Além disso, a combinação de diferentes ferramentas neste trabalho
1845 mostrou-se essencial para obter informações mais precisas sobre os danos causados nos ecossistemas
1846 aquáticos devido à expansão desordenada das atividades antrópicas e consequente redução da cobertura
1847 vegetal ao redor dos corpos d'água, alterando o equilíbrio do ecossistema aquático.

1848 Este estudo demonstrou a influência do tipo de uso e cobertura do solo e parâmetros físico-
1849 químicos sobre os danos toxicogenéticos, o que pode ser atribuído ao escoamento superficial de efluentes
1850 para dentro do rio. Ressaltamos assim, a importância do desenvolvimento de projetos voltados para a
1851 recuperação da vegetação, especialmente em áreas com reduzida ou sem qualquer tipo de cobertura causada
1852 pelo desmatamento, como apresentado neste estudo, para manter a qualidade dos recursos hídricos e
1853 consequentemente da biota aquática.

1854

1855 **Agradecimentos**

1856 Os autores gostariam de agradecer a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)
1857 localizada no Estado do Mato Grosso do Sul, pelo apoio logístico, e a Fundação de Apoio ao
1858 Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo
1859 apoio financeiro.

1860

1861 **Conflito de interesse**

1862 Os autores declaram não ter conflito de interesse.

1863

1864 **6 Referências**

1865 Arcaute CR, Soloneski S, Larramendy ML (2016) Toxic and genotoxic effects of the 2,4-
1866 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*.
1867 *Ecotoxicol Environ Saf* 128:222-229. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.027.

1868

1869 Barbosa JS, Cabral TM, Ferreira DN, Agnez-Lima LF, Medeiros SR (2010) Genotoxicity assessment in
1870 aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol and Environ Saf* 73:320-325.
1871 Doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.10.008.

1872

1873 Batista NJC, Carvalho AA, Cavalcante M, Oliveira MG, Medeiros ECN, Machado JL, Evangelista SR,
1874 Dias JF, Santos CEI, Duarte A, Silva FR, Silva J (2016) Genotoxic and mutagenic evaluation of water
1875 samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. *Chemosphere* 164:134-141.
1876 Doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.091.

1877

1878 Bianchi J, Espindola ELG, Marin-Morales MP (2011) Genotoxicity and mutagenicity of water samples
1879 from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol and Environ Saf* 74:826-
1880 833. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.11.006

1881

1882 Boerth DW, Eder E, Stanks JR, Wanek P, Wacker M, Gaulitz S, Skyeck D, Pandolfo D, Yashin M (2008)
1883 DNA Adducts as Biomarkers for Oxidative and Genotoxic Stress from Pesticides in Crop Plants. *J. Agric.*
1884 *Food Chem* 56:6751-6760. Doi: 10.1021/jf072816q.

1885

1886 Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R (2011) Micronuclei and pesticide exposure.
1887 Mutagenesis 26:19-26. Doi: 10.1093/mutage/geq070.
1888

1889 Bua H, Meng W, Zhang Y, Wan J (2014) Relationships between land use patterns and water quality in the
1890 Taizi River basin, China. Ecological Indicators 41:187–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.02.003>.
1891

1892 Caires EF Barth G, Garbuió FJ, Churka S (2008) Effects of soil acidity amelioration by surface liming on
1893 no-till corn, soybean, and wheat root growth and yield. European Journal of Agronomy 28:57-64.
1894 <https://doi.org/10.1016/j.eja.2007.05.002>.
1895

1896 Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ
1897 biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian J. Fish Sci 47:2123-
1898 2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>.
1899

1900 Castro e Sousa JM, Peron AP, da Silva e Sousa L, Holanda MM, Lima AMV, Oliveira VA, da Silva FCC,
1901 Lima LHGM, Matos LA, Dantas SMMM, de Aguiar RPS, Islam MT, Melo-Cavalcante AAC, Bonecker
1902 CC, Junior HFJ (2017) Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (PiauÍ, Brazil), influenced by
1903 anthropogenic action. Environ Monit Assess 189:1-11. Doi: 10.1007/s10661-017-6015-2.
1904

1905 Çavas T, Konen S (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish
1906 (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay.
1907 Mutagenesis 22:263–268. Doi: 10.1093/mutage/gem012.
1908

1909 Collins AR, Dusinská M (2002) Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. Methods Mol
1910 Biol 186:147-59. Doi: 10.1385/1-59259-173-6:147
1911

1912 Companhia Tecnológica de Saneamento Ambiental (CETESB) (2005) Relatório de qualidades das águas
1913 interiores do estado de São Paulo 2004/CETESB. [http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-](http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasInteriores_2017_02-06_VF.pdf)
1914 [content/uploads/sites/12/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasInteriores_2017_02-06_VF.pdf](http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasInteriores_2017_02-06_VF.pdf). Accessed 27
1915 April 2018.
1916

1917 Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (2005). Resolução número 357, de 17 de março de
1918 2005. [http:// www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf). Accessed 20 November 2017.
1919

1920 da Rocha MP, Dourado PLR, CaDRoso CAL, Cândido LS, Pereira JG, de Oliveira KMP, Grisolia AB
1921 (2018) Tools for monitoring aquatic environments to identify anthropic effects. Environ Monit Assess
1922 190:1-13. Doi: 10.1007/s10661-017-6440-2.
1923

1924 Dusman E, Luzzza M, Savegnago L, Lauxen D, Vicentini VEP, Tonial IB, Sauer TP (2014) *Allium cepa* L.
1925 as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco
1926 Beltrão, Paraná, Brazil. Environ Monit Assess 186: 1793–1800. Doi: 10.1007/s10661-013-3493-8.
1927

1928 Environmental Systems Research Institute (ESRI). ArcGIS test GIS for the desktop, versão 10.3. Maps
1929 throughout this article were created using ArcGIS® software by Esri trial version. ArcGIS® and ArcMap™
1930 are the intellectual property of Esri. Copyright © Esri. All rights reserved. For more information about
1931 Esri® software, please visit www.esri.com, 2015.
1932

1933 Ferreira PS, da Silva CA (2017) Reclassificação e quantificação da cobertura vegetal nativa da bacia
1934 hidrográfica do Rio Brilhante-MS. Doi: <https://doi.org/10.20396/sbgfa.v1i2017.1828>. Accessed 27 April
1935 2017.
1936

1937 Fiskejo G (1985) The *Allium* test: a standard in environmental monitoring. Hereditas 102:99-112.
1938 <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>.
1939

1940 Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2008) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic
1941 environments. Mutat Res 681:80-92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>.
1942

1943 Ghisi NC, Oliveira EC, Fávoro LF, Assis HCS, Prioli AJ (2014) In Situ Assessment of a Neotropical Fish
1944 to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. Bull Environ Contam
1945 Toxicol 93:699–709.

1946

1947 Ghisi NC, Ramsdorf WA, Ferraro MVM, Almeida MIM, Ribeiro CAO, Cestari MM (2011) Evaluation of

1948 genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil.

1949 Environ Monit and Assess 180:589–599. Doi: 10.1007/s10661-010-1807-7.

1950

1951 Grisolia CK, Starling FLRM (2001) Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence

1952 of sewage treatment plant discharges. Mutation Research 491:39–44. [https://doi.org/10.1016/S1383-](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00168-6)

1953 [5718\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00168-6).

1954

1955 Helms BS, Schoonover JE, Feminella JW (2009) Assessing Influences of Hydrology, Physicochemistry,

1956 and Habitat on Stream Fish Assemblages Across a Changing Landscape. Journal of the American Water

1957 Resources Association 45:157-169. Doi: 10.1111/j.1752-1688.2008.00267.x

1958

1959 Houghton DC, Wasson JL (2013) Abrupt biological discontinuity in a small Michigan (USA) stream due

1960 to historical riparian canopy loss. Journal of Freshwater Ecology 28:293-306.

1961 <https://doi.org/10.1080/02705060.2013.774298>.

1962

1963 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

1964 Censo Demográfico. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/dourados/panorama>. Accessed 07 November

1965 2017.

1966

1967 Leme DM, Marin-Morales MA (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its

1968 application. Mutat Res 682:71-81. Doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.

1969

1970 Lorente C, Causape J, Glud RN, Hancke K, Merchan D, Muniz S, Val J, Navarro E (2015) Impacts of

1971 agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in

1972 benthic algal communities. Sci Total Environ 503:151-158. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.108.

1973

1974 Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H (1995) The improved *Allium/Vicia*

1975 root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. Mutat Res 334:185-195.

1976 [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1).

1977

1978 Manzano BC, Roberto MM, Hoshina MM, Menegário AA, Marin-Morales MA (2015) Evaluation of the

1979 genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of

1980 São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. Environmental Science and Pollution Research

1981 22:1399–1407. Doi: 10.1007/s11356-014-3476-5.

1982

1983 Marinelli CE, Moretto EM, Brucha G, Lucca JV (2000) Limnologia. In: Espíndola, E. L. G.; Silva, J. S.

1984 V.; Marinelli, C. E. and Abdon, M. M. A Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho: uma abordagem

1985 ecossistêmica e a visão interdisciplinar. São Carlos: RiMa, 133-149.

1986

1987 Marotta H, Santos RO, Enrich-Prast, A (2008) Monitoramento limnológico: um instrumento para a

1988 conservação dos recursos hídricos no planejamento e na gestão urbano-ambientais. Ambiente & Sociedade

1989 11:67-79. <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-753X2008000100006>.

1990

1991 Matos LA, Cunha ACS, Sousa AA, Maranhão JPR, Santos NRS, Gonçalves MMC, Dantas SMMM, Sousa

1992 JMC, Peron AP, da Silva FCC, de Alencar MVOB, Islam MT, de Aguiar RPS, Melo-Cavalcante AAC,

1993 Bonecker CC, Junior HFJ (2017) The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian

1994 tropical river. Chemosphere 185:852-859. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.103>.

1995

1996 Message HJ, Santos DA, Baumgartner MT, Affonso IP (2016) Planícies de inundação a Biodiversidade do

1997 rio Paraná ameaçada. Ciência Hoje 334:36-39

1998

1999 Radić S, Stipanicev D, Vujcic V, Rajcic MM, Sirac S, Pevalék-Kozlina B (2010) The evaluation of surface

2000 and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. Science of the Total Environment 408:1228–1233.

2001 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.055>.

2002

2003 Scorza Júnior RP, Silva JP (2006) Avaliação do Potencial de Contaminação dos Recursos Hídricos por

2004 Pesticidas na Bacia do Rio Dourados, MS. R Ecotoxicol e Meio Ambiente 17:87-106.

2005

2006 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantization of low levels
2007 of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184–191. Doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
2008
2009 Sousa DMG, Lobato E (2004) *Cerrado: correção do solo e adubação*. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa.
2010
2011 Suárez YR, Souza MM, Ferreira FS, Pereira MJ, Silva EA, Ximenes LQL, Azevedo LG, Martins OC, Lima-
2012 Junior SE (2011) Patterns of species richness and composition of fish assemblages in streams of the
2013 Ivinhema River basin, Upper Paraná River. *Acta Limnol. Bras* 23:177-188.
2014 <http://dx.doi.org/10.1590/S2179-975X2011000200008>.
2015
2016 Tabrez S, Shakil S, Urooj M, Damanhoury GA, Abuzenadah AM, Ahmad M (2011). Genotoxicity testing
2017 and biomarker studies on surface waters: An overview of the techniques and their efficacies. *J Environ Sci*
2018 *Health* 29:250-275. Doi: 10.1080/10590501.2011.601849.
2019
2020 Trujillo-Jiménez P, Sedeño-Díaz JE, Camargo JA, López-López E (2011) Assessing environmental
2021 conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax*
2022 *aeneus* (Günther, 1860). *Ecol Indic* 11:1636–1646. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.04.007>.
2023
2024 Udrouiu I (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat Toxicol* 79:201–204.
2025 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>.
2026
2027 Vujosević M, Anđelković S, Savić G, Blagojević J (2008) Genotoxicity screening of the river Rasina in
2028 Serbia using the *Allium* anaphase-telophase test. *Environmental Monitoring and Assessment* 147:75–81.
2029 Doi: 10.1007/s10661-007-0099-z.
2030
2031 Yamamoto FY, Pereira MVM, Lottermann E, Santos GS, Stremel TRO, Doria HB, Gusso-Choueri P,
2032 Campos SX, Ortolani-Machado CF, Cestari MM, Filipak Neto F, Azevedo JCR, Oliveira Ribeiro CA
2033 (2016) Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from
2034 Iguaçu River (Southern Brazil). *Environmental Science and Pollution Research* 23:18111-28. Doi:
2035 10.1007/s11356-016-6924-6.
2036
2037 Zampella RA, Nicholas AP (2007) Relationship of land-use/land-cover patterns and surface water
2038 quality in the Mullica River Basin. *Journal of the American Water Resources Association* 43:594 – 604.
2039 <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2007.00045.x>.
2040
2041 Zandoná RR, Beutler AN, Burg GM, Barreto CF, Schmidt MR (2015) Gesso e calcário aumentam a
2042 produtividade e amenizam o efeito do déficit hídrico em milho e soja. *Pesq Agropec Trop* 45:128-137.
2043 <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v45303>.
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065

2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104

O Artigo 3 intitulado: **Contaminantes emergentes em rios brasileiros: ocorrência e efeitos na expressão gênica em embriões de zebrafish (*Danio rerio*)** foi aceito para publicação na Revista **Chemosphere** (Qualis A1, Área interdisciplinar / Fator de Impacto: 4.208)

2105 **Contaminantes emergentes em rios brasileiros: ocorrência e efeitos na expressão gênica em**
2106 **embriões de zebrafish (*Danio rerio*)**

2107

2108 Juliana C. V. Sposito^a, Cassiana C. Montagner^b, Marta Casado^c, Laia Navarro-Martín^c, Julio César Jut
2109 Solórzano^d, Benjamin Piña^e, Alexeia B. Grisolia^e

2110

2111 ^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD,
2112 Dourados, MS, Brasil.

2113 ^b Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas,
2114 Campinas, São Paulo, Brasil.

2115 ^c Departamento de Química Ambiental, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Espanha.

2116 ^d Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul / UEMS, Dourados, MS, Brasil.

2117 ^e Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD,
2118 Dourados, MS, Brasil.

2119 Autor correspondente. E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br. Número de telefone: +55 (67) 34102223.

2120

2121 **Destaques**

2122 • A ocorrência de contaminantes emergentes (CEs) foi investigada em rios na região sul do Estado
2123 do Mato Grosso do Sul, Brasil.

2124 • Avaliamos o potencial de toxicidade de misturas na expressão gênica em embriões de zebrafish.

2125 • Misturas de CEs em três locais de amostragem induziram a expressão dos genes *cat*, *cyp19a1b* e
2126 *cyp1a*.

2127

2128 **Resumo**

2129 Contaminantes emergentes (CEs) são substâncias químicas sintéticas ou de ocorrência natural que não são
2130 comumente monitoradas, apesar de possuírem o potencial de permanecer no ambiente e causar efeitos
2131 adversos à saúde ecológica e / ou humana. Este trabalho tem como objetivo determinar a presença de CEs
2132 em águas superficiais de dois rios do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, e avaliar os efeitos na expressão
2133 de genes alvos de misturas em concentrações ambientalmente relevantes. As concentrações de CEs foram
2134 determinadas por extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-

2135 MS/MS). Os CEs mais frequentemente detectados foram cafeína, imidacloprido, 2-hidroxiatrazina,
2136 tebutiuron, atrazina e bisfenol A. Utilizamos esses dados para reconstruir misturas de CEs refletindo as
2137 concentrações ambientais, denominados (T1, T2 e T3). Considerando que nestas condições os efeitos não
2138 foram observados, as concentrações foram aumentadas. Assim, após avaliação preliminar da concentração
2139 sem efeito observado (NOEC) para cada mistura, foram analisadas as mudanças na expressão de genes alvo
2140 de zebrafish (*cyp1a*, *hsp70*, *cat*, *sod1*, *tsh*, *cyp19a1a*, *cyp19a1b*, *cyp26b1*, *casp8*, *sox2*, *cyb561d2* e *thrb*).
2141 O gene *cat* tornou-se super-representado em T1 e sub-representado nos demais tratamentos. Todas as
2142 misturas induziram a expressão do *cyp19a1b*, um marcador para a exposição ao (xeno) estrogênio, e dois
2143 deles aumentaram a expressão do *cyp1a*, usado para indicar a presença de compostos semelhantes à dioxina.
2144 Os rios apresentaram baixas concentrações de CEs e não indicaram efeitos prejudiciais ao zebrafish. No
2145 entanto, em diferentes épocas do ano, com a intensificação das atividades agrícolas pode levar a picos
2146 insuspeitos de poluição CEs, e seus efeitos negativos subsequentes para os organismos vivos.

2147 **Palavras-chave:** Águas superficiais, risco ambiental, embriões, *Danio rerio*, toxicidade potencial.

2148

2149 1. Introdução

2150 Contaminantes emergentes (CEs) são compostos químicos, sintéticos ou naturais, incluindo
2151 compostos industriais, hospitalares, produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, produtos
2152 agrícolas e subprodutos de desinfecção (Thiele-Bruhn, 2003; Heberer, 2002; Masiá et al., 2015;
2153 RichaDRson e Ternes, 2018). Estudos mostram que os CEs podem causar efeitos em anfíbios, moluscos,
2154 peixes e humanos. No entanto, devido à escassez de informações para alguns CEs, esses compostos ainda
2155 não estão sujeitos a critérios regulatórios ou normas para a proteção da saúde humana ou do meio ambiente
2156 (Matthiessen, 2008; Hayes et al., 2010; Miodovnik et al., 2011; Zhao et al., 2017).

2157 Os CEs entram no ambiente a partir de uma variedade de fontes urbanas e rurais, incluindo
2158 escoamento superficial de terras agrícolas e pastagens, atividade industrial, resíduos de hospitais, descargas
2159 de esgotos e saídas de estações de tratamento de águas residuais. Descargas de esgoto bruto em rios e lagos,
2160 ou ineficiência de estações de tratamento de esgoto também são fontes comuns de contaminação dos corpos
2161 d'água (Matamoros et al., 2016). Além disso, os solos contaminados constituem uma fonte potencial
2162 adicional de poluição das águas superficiais e subterrâneas pelos CEs, devido o escoamento superficial e à
2163 lixiviação (Oppel et al., 2004; Xu et al., 2009).

2164 A alta concentração de alguns compostos não é necessariamente a principal preocupação
2165 ambiental, pois seus efeitos tóxicos estão fortemente relacionados à sua persistência e atividade biológica
2166 devido à exposição crônica (Stara et al., 2012). Assim, compostos atualmente não incluídos em programas
2167 de monitoramento, mas que são candidatos a regulamentações futuras, devem ser avaliados considerando
2168 a complexidade de controle e detecção. Dada a escassez de dados existentes sobre os efeitos das misturas
2169 complexas dos CEs, uma avaliação global dos efeitos causados por essas misturas em organismos vivos
2170 está se tornando uma necessidade.

2171 O *Danio rerio* (Zebrafish) tem sido amplamente utilizado como organismo modelo, pois apresenta
2172 várias vantagens, como tamanho pequeno, desenvolvimento extra-uterino, ciclo reprodutivo curto e
2173 embriões transparentes (Feitsma e Cuppen, 2008). O peixe-zebra é amplamente utilizado em estudos de
2174 toxicidade ambiental para monitorar metais pesados, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos (Dai
2175 et al., 2014), bem como na avaliação de outros contaminantes em estudos de qualidade da água (Kuster et
2176 al., 2008). A análise de parâmetros morfológicos, bioquímicos, citológicos e moleculares têm sido
2177 utilizados para determinar os efeitos de muitos tipos de poluentes ambientais, tanto em embriões quanto
2178 em adultos (Zhang et al., 2003; Raldua et al., 2013; Raldua e Piña, 2014).

2179 O peixe-zebra tem sido amplamente utilizado em estudos com CEs, considerando a relação de
2180 efeitos já observados neste organismo, incluindo a estrogenicidade (Zhao et al., 2017); efeito inibitório na
2181 atividade locomotora (Tran et al., 2017); disfunção reprodutiva, alterações morfológicas (WiBRisky et al.,
2182 2016); apoptose celular; toxicidade imune, alterações em proteínas e expressão gênica. Muitos genes têm
2183 sido relatados com alterações transcricionais devido CEs, incluindo: *cyp1a*, *hsp70*, *cat*, *sod1*, *tsh*, *cyp19a1a*,
2184 *cyp19a1b*, *cpy26b1*, *casp8*, *sox2*, *cyb561d2* e *thrb*, verificando o efeito desses compostos na expressão
2185 gênica de organismos vivos (Jin et al., 2010; Abdelkader et al., 2012; Pinto et al., 2013; Glisic et al., 2014;
2186 Jiang et al., 2015; Zhou et al., 2016; Guo et al., 2017).

2187 Os rios Dourados e Brilhante, localizados na região sul do Estado do Mato Grosso do Sul, são
2188 importantes rios utilizados para irrigação em atividades rurais locais, aquicultura, pesca, além de fornecer
2189 água potável para pessoas que vivem nas margens destes rios. No entanto, a qualidade da água dos rios
2190 pode ser comprometida, considerando a forte atividade agrícola e a ausência de tratamento de esgoto em
2191 algumas cidades ribeirinhas. Nesse contexto, os CEs podem estar presentes em amostras de água dos
2192 recursos hídricos. Além disso, embora as estações de tratamento de esgoto tenham uma alta taxa de

2193 remoção, algumas CEs não são efetivamente removidas do esgoto após o tratamento, impactando
2194 negativamente a biota aquática (Montagner et al., 2014; Message et al. 2016).

2195 Assim, considerando o pouco conhecimento sobre a presença de CEs em rios localizados na região
2196 sul do Estado de Mato Grosso do Sul e a precariedade de dados quanto à toxicidade de misturas de CEs.
2197 Este estudo tem como objetivo determinar a presença de CEs (pesticidas, fármacos, compostos industriais
2198 e de estilo de vida) em águas superficiais dos rios Dourados e Brilhante e avaliar os possíveis efeitos de
2199 misturas de CEs em concentrações ambientalmente relevantes em genes alvo de exposição à poluição em
2200 embriões de zebrafish.

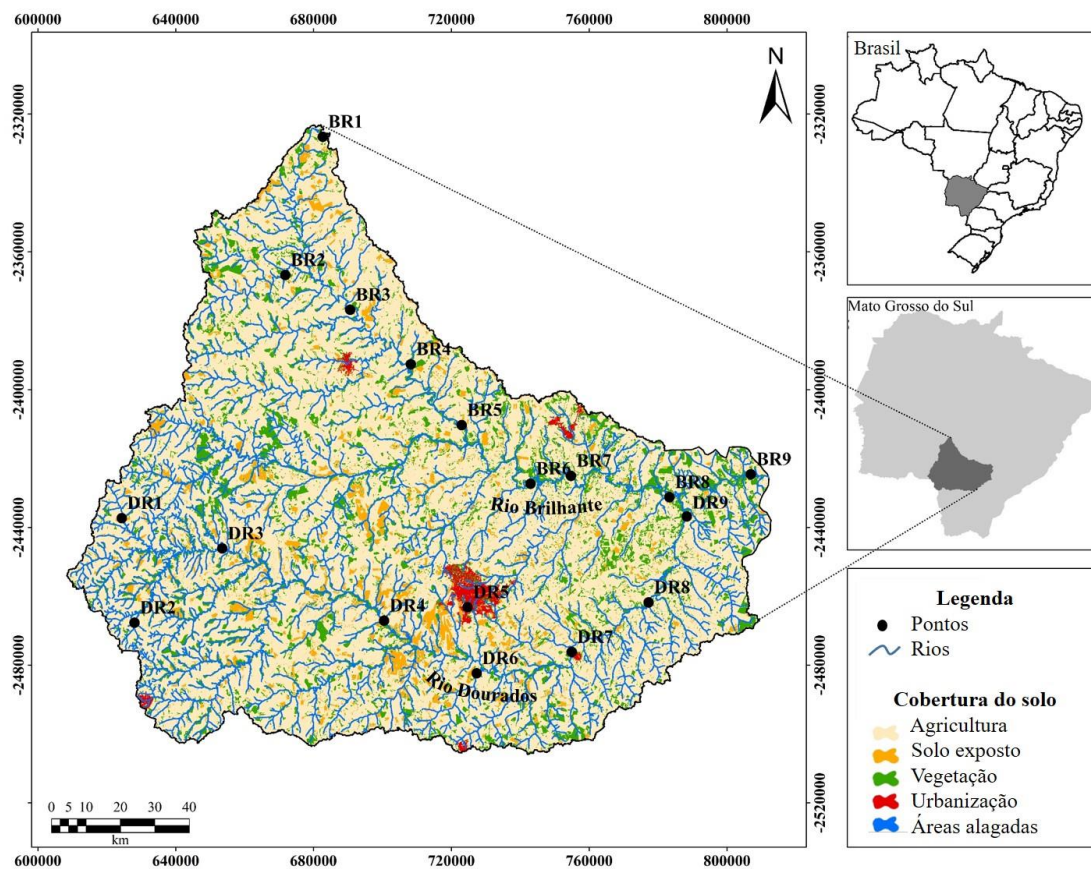
2201

2202 2. Materiais e métodos

2203 2.1 Local de estudo e amostragem

2204 Este estudo teve como foco dois rios, Dourados e Brilhante (DR e BR, respectivamente),
2205 localizados na bacia do Alto do Rio Paraná, região sul do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Fig. 1).

2206



2207

2208 **Fig. 1.** Uso do solo e localização dos pontos de amostragem rios Dourados e Brilhante (DR e BR,
2209 respectivamente), Mato Grosso do Sul, Brasil.

2210 O DR tem uma extensão de 370 Km e corresponde a um importante rio da região no abastecimento
2211 de água para a cidade de Dourados, considerada a segunda maior cidade do estado em número de habitantes
2212 (218.000), bem como para vários outros municípios (IBGE, 2017). A região do DR é ocupada
2213 predominantemente pela agricultura (56%), além de áreas urbanas (20%) e áreas menores ocupadas por
2214 florestas (16,5%) e pastagens (1,5%). Por outro lado, com uma extensão de 344 km, o BR também é
2215 ocupado predominantemente por atividades agrícolas (57%), seguida de cobertura florestal (19,5%) e
2216 pastagens (7%). A urbanização representa apenas 4,6% do uso da terra, incluindo as cidades de Sidrolândia,
2217 Rio Brilhante, Maracaju, Douradina, Itaporã, Dourados e Angélica, inseridas total ou parcialmente em seus
2218 limites, e que dependem do BR para seu suprimento de água doce (EMBRAPA, 2015).

2219 Uma amostra de água superficial foi coletada em junho de 2016 (inverno) em nove pontos de
2220 amostragem de cada rio (dezoito amostras no total) a uma profundidade de aproximadamente 20 cm usando
2221 garrafas de vidro âmbar pré-lavadas de 1L. Após a coleta, as amostras foram transportadas sob refrigeração
2222 e armazenadas a 4 °C até análise. Os locais de amostragem foram selecionados de acordo com as
2223 características do rio, da montante a jusante do rio, e devido as atividades desenvolvidas ao longo dos rios.

2224

2225 *2.2 Determinação de contaminantes emergentes (CEs) na água*

2226 Considerando a atividade urbana e agroindustrial ao longo dos rios, este estudo avaliou a presença
2227 de vinte e um compostos considerados CEs: cafeína, imidacloprido, carbendazim, atrazina, 2-
2228 hidroxiatrazina, carbofurano, hexazinona, tebutiuron, diuron, clomazone, ametryn, malathion, testosterona,
2229 tebuconazole, progesterona, estriol, 17 α -etinilestradiol, bisfenol A, fipronil, triclosan e octilfenol.

2230 O preparo da amostra foi realizado segundo Montagner e Jardim (2011), com algumas
2231 modificações. Amostras de águas superficiais foram transportadas para o laboratório e processadas durante
2232 as 24 h seguintes. Cada amostra de 1L foi filtrada através de membranas de acetato de celulose com tamanho
2233 de poro de 0,45 μ m (Sartorius, Alemanha) e o filtrado foi extraído usando cartuchos HLB Oasis de 500 mg
2234 / 6cc (Waters, Milford, EUA). O condicionamento dos cartuchos foi realizado usando 6 mL de metanol e 6
2235 mL de água ultrapura. Os compostos alvo foram eluídos com duas aluotas de 5 mL de metanol e uma
2236 alíquota de 2 mL de acetonitrila. O passo de eluição foi realizado utilizando um distribuidor de vácuo de
2237 12 portas do tipo Manifold (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA) com tubos de vidro pré-lavados
2238 apropriados. Os solventes foram cuidadosamente evaporados até total secagem dos tubos com um fluxo

2239 suave de azoto, e os compostos alvo foram ressuspensos até um volume final de 0,4 mL de água/metanol
2240 70/30 (v/v).

2241 A análise de CEs foi realizada utilizando espectrometria de massa em tandem de cromatografia
2242 líquida (LC-MS/MS), em um sistema LC Agilent 1200 Series acoplado a um espectro de massa Agilent
2243 6410 Triple Quad equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização (ESI). Monitoramento de
2244 reação múltipla (MRM) foi usado para realizar a quantificação por espectrometria de massa. A
2245 quantificação foi feita utilizando calibração padrão externa e o limite de detecção instrumental (LDI) variou
2246 entre 5 e 250 pg (Tabela 1 - Material suplementar). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do
2247 método consideraram o fator de concentração (2000x) e foram obtidos de acordo com Miller e Miller
2248 (2005), que variaram entre 1,8 e 66 ng L⁻¹ (Tabela 4).

2249

2250 2.3 Químicos

2251 Soluções estoque foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), com exceção da cafeína
2252 preparada em água. Todos os químicos utilizados na preparação de soluções foram reagentes de grau
2253 analítico ($\geq 98\%$ de pureza) e adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Soluções experimentais com as
2254 mesmas concentrações finais de DMSO (0,2% v/v) foram obtidas pela dissolução dos estoques com a água
2255 de peixe. Esta concentração de DMSO está na faixa mais alta tolerável conhecida por não induzir efeitos
2256 macroscópicos, e facilitar a permeabilidade dos compostos adicionados (Hallare, 2006).

2257

2258 2.3.1 Animais e condições de criação

2259 Indivíduos adultos de zebrafish do tipo selvagem (*Danio rerio*) foram adquiridos de um
2260 revendedor local e mantidos em instalações de alojamento de animais certificados (IDAEA-CSIC,
2261 Barcelona, Espanha) em água purificada por osmose reversa contendo 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Instant Ocean
2262 (Aquarium Systems, Sarrebourg, França) e CaSO₄2H₂O 0,58 mM a 28 °C (± 1) (água de peixe). Os
2263 embriões foram obtidos por acasalamento natural colocando 5 fêmeas e 3 machos em tanques de criação
2264 de 4 L com fundo de malha. Ovos viáveis fertilizados foram distribuídos aleatoriamente em placas de seis
2265 poços (10 ovos/poço) contendo 8 mL de água de peixe e criados a 28,5 °C com um fotoperíodo de 12 Light:
2266 12 Dark. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes institucionais sob uma
2267 licença do governo local (DAMM 7669, 7964) e foram aprovados pelos Comitês Institucionais de Cuidados
2268 e Uso Animal no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento do Conselho Espanhol de Pesquisa (CID-CSIC).

2269 2.3.2 *Exposição para análise da expressão gênica*

2270 De acordo com o cenário de contaminação observado nos rios, e com base nos resultados da análise
 2271 de componentes principais (PCA), verificou-se a formação de dois clusters, DR e BR. No entanto, o local
 2272 DR5 apresentou comportamento distinto em relação aos demais locais de amostragem, e por isso este local
 2273 também foi incluído como tratamento (Fig. 2). Consequentemente, três tratamentos diferentes (BR =
 2274 Tratamento 1, DR = Tratamento 2 e DR5 = Tratamento 3) foram determinados para análise molecular.

2275 Testes preliminares foram realizados para a exposição de embriões de zebrafish, baseados em água
 2276 reconstituída contendo mistura de CEs e nas mesmas concentrações determinadas nos rios. Detalhes sobre
 2277 a concentração de cada composto e tratamento são mostrados na Tabela 2.

2278

2279 **Tabela 2** Concentrações ambientais de contaminantes emergentes nos pontos de amostragem dos rios
 2280 Dourados e Brillante e média da concentração de cada tratamento para análise de expressão gênica.

Rios	Tratamento	Contaminantes emergentes (CEs)	Média da concentração de CEs nos rios (ng L ⁻¹)	Concentração de CEs para análise de expressão gênica (µg L ⁻¹)
Rio Brillante (BR)	T1	Cafeína	36,7	747
		Imidacloprido	31,4	639
		2-hidroxiatrazina	72,3	1471
		Hexazinona	12,7	258
		Tebutiuron	25,0	508
		Atrazina	42,1	857
		Diuron	6,2	126
		Estriol	10,7	218
		Bisfenol A	29,5	600
Rio Dourados (DR)	T2	Cafeína	46,3	1816
		Imidacloprido	23,9	938
		2-hidroxiatrazina	25,1	985
		Tebutiuron	10,4	408
		Diuron	7,0	275
Bisfenol A	15,3	600		
Ponto 5 do rio Dourados (DR5)	T3	Cafeína	1040	302
		Carbendazim	96,0	27,8
		2-hidroxiatrazina	19,4	5,62
		Diuron	11,7	3,39
		Malathion	50,4	14,6
		Estriol	11,9	3,45
		Bisfenol A	20,7	6,00
		17 α-etinilestradiol	38,5	11,1
		Fipronil	29,2	8,46
Triclosan	8,6	2,49		

2281

2282 Entretanto, considerando que nestas condições não foram observados efeitos em embriões, as
 2283 concentrações foram aumentadas, até a determinação do valor da concentração sem efeito observado
 2284 (NOEC), usado para análise de expressão gênica. O aumento nas concentrações de CEs reflete a situação

2285 ambiental em diferentes épocas ou a intensificação das atividades antrópicas, aumentando o nível de
2286 contaminação dos recursos hídricos pelos CEs.

2287 Após determinação do valor de NOEC, foi realizado um novo experimento, seguindo as
2288 concentrações para a análise da expressão gênica (Tabela 2). Às 48 horas pós-fertilização (hpf), os embriões
2289 de zebrafish foram transferidos para placas de 6 poços (10 larvas por poço) e expostos aos tratamentos
2290 durante 3 dias. DMSO (0,2 % v/v) foi utilizado como controle para exposição dos embriões de zebrafish.

2291

2292 2.3.3 Extração de RNA

2293 Após o período de exposição, 10 embriões por réplica (n = 60) foram armazenados a -80 °C para
2294 análise da expressão gênica. O RNA total foi extraído utilizando o Reagente TRIzol (Invitrogen Life
2295 Technologies, Carlsbad, CA). A concentração e qualidade do RNA foi medida por absorção
2296 espectrofotométrica utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (Thermo Fisher Scientific,
2297 Wilmington, EUA). Após o tratamento com DNase I, o RNA total foi transcrito em cDNA utilizando o Kit
2298 de Síntese (Roche Diagnostics) seguindo os protocolos do fabricante.

2299

2300 2.3.4 Análise de RT-qPCR

2301 Para RT-qPCR, cada amostra continha 2 µL de cDNA, 6 µL de água livre de nuclease, 2 µL de
2302 primer (primer forward e reverse) e 10 µL de SYBR® Master Green (Roche, Mannheim, Alemanha). As
2303 seqüências de primers usadas para a análise qRT-PCR estão listadas na Tabela 3 (Informação suplementar).
2304 Reações de PCR em tempo real foram realizadas no LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche
2305 Diagnostics, Mannheim, Alemanha). O programa de amplificação utilizado consistiu em 10 min a 95 °C,
2306 seguido de 45 ciclos (10 s a 95, 30 s a 60). Após a amplificação, uma análise de dissociação também foi
2307 programada para avaliar a especificidade da reação. Dois controles negativos, *non-template* e *RTminus*,
2308 foram incluídos em cada placa, para avaliar a presença de *primers*-dímeros, contaminação e a DNA
2309 genômico. Para cada condição experimental, foram realizadas análises de qPCR com seis repetições
2310 biológicas em cada condição e duas réplicas para cada amostra. O gene *housekeeping*, *ppia2*, foi
2311 selecionado como controle interno. Os primers foram projetados usando o software Primer Express 2.0
2312 (Applied Biosystems, Foster City, CA), o servidor Primer-Blast e sintetizados pela Sigma. Onze transcritos
2313 foram analisados: *cyp1a*, *hsp70*, *cat*, *sod1*, *tsh*, *cyp19a1a*, *cyp19a1b*, *cyp26b1*, *casp8*, *sox2*, *cyb561d2*.

2314 A eficácia da reação de amplificação de cada gene alvo foi avaliada por diluições em série de cDNA
2315 e submetida a amplificação nas mesmas condições que acima. As abundâncias relativas de mRNA dos
2316 diferentes genes foram calculadas a partir do segundo derivado máximo de suas respectivas curvas de
2317 amplificação (C_p , calculado por duplicatas). Para minimizar os erros na quantificação do RNA entre as
2318 diferentes amostras, os valores de C_p para genes alvo (C_{ptg}) foram normalizados para os valores médios
2319 de C_p do gene de referência, seguindo a equação: $\Delta C_{ptg} = C_{ppia2} - C_{ptg}$. As alterações na abundância de
2320 mRNA em amostras de diferentes tratamentos foram calculadas pelo método $\Delta\Delta C_p$ (Pfaffl, 2001), usando
2321 valores de C_p corrigidos de amostras tratadas e não tratadas, seguindo a equação: $\Delta\Delta C_{ptg} =$
2322 $\Delta C_{ptg_n\grave{a}otratado} - \Delta C_{ptg_tratado}$. As taxas de troca dobrada foram derivadas daqueles valores $\Delta\Delta C_{ptg}$.

2323

2324 *2.4 Análise dos dados*

2325 O agrupamento de pontos de amostragem com os dados químicos foi realizado usando Análise de
2326 Componentes Principais (PCA). A PCA é um método de redução de dimensão não supervisionada que
2327 permite a exploração visual de correlações (Wold et al., 1987), aumentando a compreensão dos dados mas,
2328 ao mesmo tempo, minimizando a perda de informação (Jolliffe e Cadima, 2016). A análise dos dados do
2329 qRT-PCR foi realizada utilizando os valores de $\Delta\Delta C_p$, os quais foram distribuídos normalmente de acoDRo
2330 com o teste de Levene. Análises estatísticas de alterações relativas na expressão gênica entre controle e
2331 tratamento foram avaliadas por ANOVA mais teste post-hoc de Tukey para correção de múltiplos testes.
2332 Correlações entre valores de $\Delta\Delta C_p$ e concentrações químicas de diferentes compostos foram calculadas
2333 usando as correlações de Pearson. Valores foram considerados estatisticamente significantes quando p
2334 $< 0,05$. Todas as análises foram realizados utilizando o programa RStudio 3.2.2.

2335

2336 **3. Resultados**

2337 *3.1 Análise de Contaminantes Emergentes (CEs)*

2338 Dentre os vinte e um CEs analisados, apenas quatorze foram quantificados em concentrações
2339 acima do limite de quantificação (LQ) do método analítico em amostras de água do DR e BR como cafeína,
2340 imidacloprido, carbendazim, atrazina, 2-hidroxiatrazina, hexazinona, tebutiuron, diuron, malathion, 17 α -
2341 etinilestradiol, bisfenol A, estriol, fipronil e triclosan (Tabela 4). Os demais CEs estavam abaixo do limite
2342 de detecção ($<LD$) em todas as amostras de água investigadas.

2343
2344

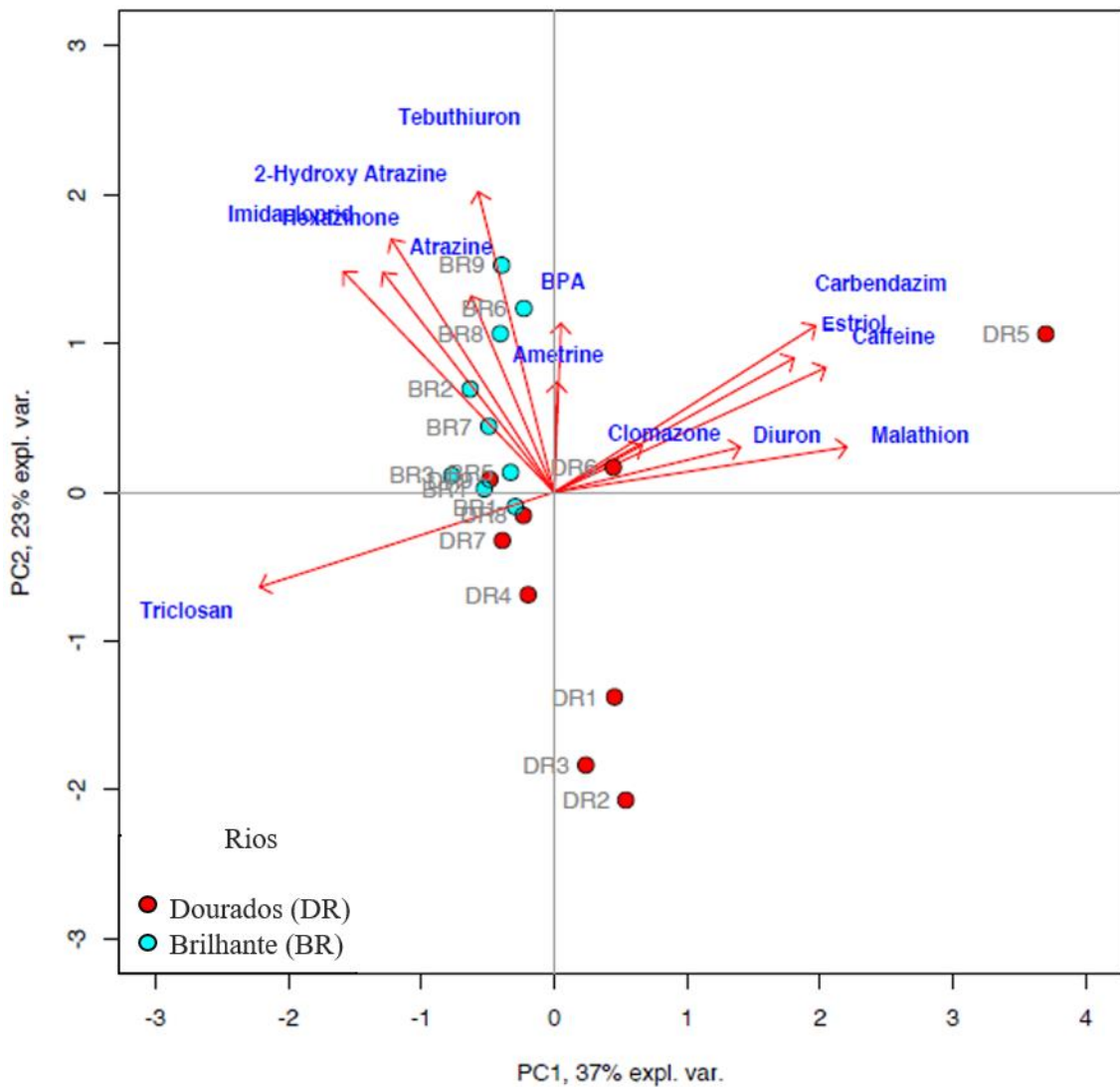
Tabela 4: Concentrações ambientais de contaminantes emergentes (ng L⁻¹) nos pontos de amostragem dos rios Dourados e Brilhante. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

	Rio Dourados									Rio Brilhante									LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Cafeína	<LQ	28,4	<LQ	20,0	1040	127,4	34,5	45,9	21,7	50,5	<LQ	<LQ	31,3	21,6	50,3	26,7	<LQ	39,9	6	19,8	
Imidacloprido	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	20,6	21,0	30,1	16,3	24,9	53,5	23,8	17,9	36,0	27,3	42,2	40,7	5,3	17,4	
Carbendazim	<LD	<LD	<LD	<LD	96,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LQ	2,7	8,8	
Atrazina	<LQ	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	171,3	<LQ	25,1	19,1	17,1	23,8	24,6	28,2	27,3	3,9	12,8	
2-hidroxiatrazina	18,6	<LQ	19,0	20,9	19,4	30,7	31,2	29,6	47,8	129,5	60,1	55,1	52,3	51,5	65,2	66,5	92,9	77,5	2,7	9,0	
Hexazinona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LOD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	16,0	<LQ	<LQ	<LQ	9,3	<LQ	<LQ	<LQ	2,5	8,1	
Tebutiuron	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,4	<LD	16,4	11,9	<LQ	10,4	44,1	33,9	22,2	36,4	3,0	9,9	
Diuron	<LD	7,0	<LD	<LD	11,7	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	6,2	<LQ	<LD	<LD	1,8	5,8	
Malathion	<LQ	<LD	<LD	<LD	50,4	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,9	9,5	
17 α-etinilestradiol	<LD	<LD	<LD	<LD	38,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	20	66	
Bisfenol A	18,8	9,9	11,3	<LQ	20,7	<LQ	13,3	16,8	21,4	<LD	48,7	<LD	17,0	<LQ	<LQ	<LD	22,7	<LQ	9	29,7	
Estriol	<LD	<LD	<LD	<LD	11,9	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	10,7	<LD	9	29,7
Fipronil	<LD	<LD	<LD	<LD	29,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	9,2	30,4	
Triclosan	<LD	<LD	<LD	<LD	8,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	10,5	34,7	

2345

2346 Entre os CEs quantificados, os mais frequentes foram cafeína, imidacloprido, atrazina, 2-
2347 hidroxiatrazina, tebutiuron e bisfenol A. A maior concentração de cafeína 1040 e 127 ng L⁻¹ foi determinada
2348 nos pontos 5 e 6 do DR, respectivamente. O inseticida imidacloprido foi observado em todos os locais do
2349 BR em concentrações de 16,3 a 53,5 ng L⁻¹. O herbicida atrazina também foi quantificado em todos os
2350 locais de amostragem do BR, exceto no ponto 2, porém, em nenhum ponto do DR, enquanto o metabólito
2351 da atrazina, 2-hidroxiatrazina, foi encontrado em ambos os rios, exceto no ponto 2 do DR. O tebutiuron
2352 foi determinado preferencialmente em amostras de água do BR, com a maior concentração (36,4 ng L⁻¹) no
2353 ponto de amostragem 9 deste rio. O bisfenol A foi observado principalmente em amostras de água do DR,
2354 com concentrações variando de 9,9 a 48,7 ng L⁻¹. De fato, carbendazim, malathion, 17 α -etinilestradiol,
2355 fipronil e triclosan estavam presentes apenas no ponto DR5, com concentrações altas em relação aos demais
2356 pontos de amostragem.

2357 Considerando o número de locais de amostragem, a PCA foi realizada afim de analisar o
2358 comportamento dos locais de amostragem em relação às concentrações das CEs determinadas nos rios. A
2359 análise do PCA mostrou uma clara separação das amostras dos rios Dourados e Brilhante (Fig. 2, pontos
2360 vermelhos e azuis, DR e BR, respectivamente). Além disso, o local de amostragem 5 do rio Dourados
2361 (DR5) foi claramente separado do restante, refletindo sua composição química particular, devido ao alto
2362 número de CEs observados.



2363

2364 **Fig. 2.** Distribuição dos pontos de amostragem de acordo com a ocorrência e concentrações de CEs nos rios
 2365 Dourados (DR) e Brilhante (BR).

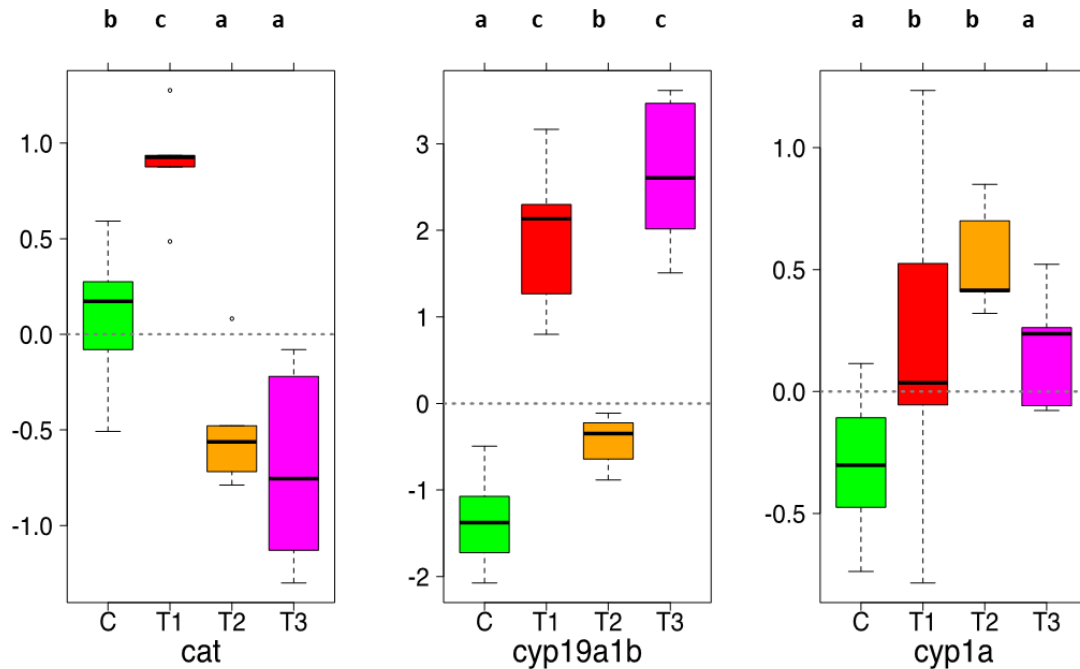
2366

2367 3.2 Análise molecular

2368 Utilizamos os resultados do PCA para definir três misturas de CEs T1, T2 e T3, afim de refletir os
 2369 níveis característicos de CEs para amostras de água dos rios BR e DR, assim como DR5, respectivamente.
 2370 As misturas reconstituídas de CEs foram utilizadas para avaliar o potencial efeito na transcrição de genes
 2371 em embriões de zebrafish (ver composições de mistura na Tabela 2).

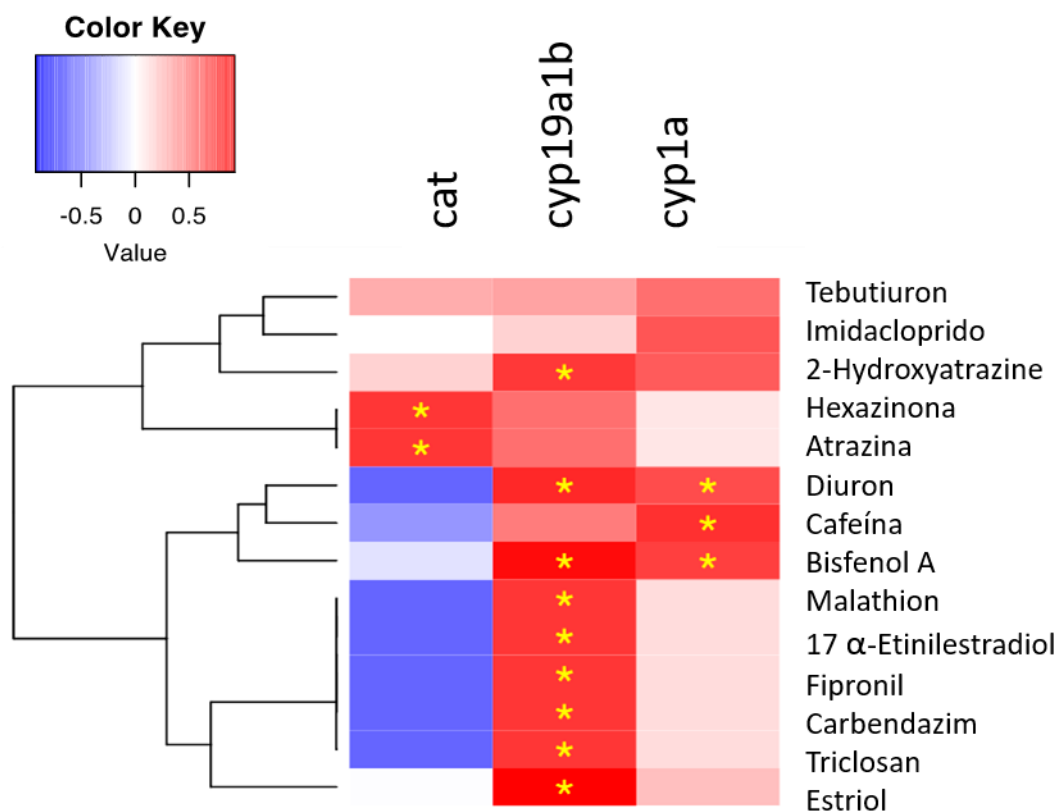
2372 Dos doze transcritos testados, apenas três deles (*cat*, *cyp19a1b* e *cyp11a*) mostraram expressão
 2373 diferencial nos diferentes tratamentos (ANOVA, mais Teste de Tukey). O gene *cat* tornou-se super-
 2374 representado no tratamento T1 e subrepresentado nos demais tratamentos (Fig. 3, painel esquerdo). As
 2375 maiores alterações na expressão gênica corresponderam à aromatase cerebral *cyp19a1b*, que aumentou em

2376 todos os três tratamentos, particularmente no T3 (Fig.3, painel central). Finalmente, o transcrito *cyp1a*,
2377 correspondente ao citocromo p450 1A, também aumentou sua abundância em todos os tratamentos,
2378 particularmente no T2, embora em menor extensão do que a aromatase (Fig. 3, painel direito).
2379



2380
2381 **Fig. 3.** Box plots representam média da expressão dos genes *cat*, *cyp19a1b* e *cyp1a* nos diferentes
2382 tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram significativamente.

2383
2384 Análises de correlação mostraram uma correlação positiva fraca entre catalase e dois herbicidas,
2385 hexazinona e atrazina (Fig. 4). Como esperado, a expressão do gene *cyp19a1b* aromatase correlacionou-se
2386 principalmente com a concentração de três compostos semelhantes ao estrogênio: estriol, 17 α -
2387 etinilestradiol e bisfenol A, além de 2-hidroxiatrazina, diuron, malathion, fipronil, carbendazim e triclosan
2388 (Fig. 4). Finalmente, os resultados mostraram correlações significativas entre o transcrito *cyp1a* e diuron,
2389 cafeína e bisfenol A (estrelas amarelas) (Fig. 4).



2390

2391 **Fig. 4.** Gráfico de correlação entre os genes *cat*, *cyp19a1b* e *cyp1a* e diferentes compostos presentes nos
 2392 tratamentos. A cor vermelha e as estrelas amarelas mostram fortes correlações entre as variáveis.

2393

2394 4. Discussão

2395 4.1 Contaminates Emergentes (CEs)

2396 A cafeína é um dos principais ingredientes de determinados produtos alimentícios e drogas e é a
 2397 substância mais utilizada em todo o mundo. É relativamente estável sob condições ambientais variáveis e
 2398 possui alta solubilidade, mobilidade na água e uma volatilidade desprezível (Buerge et al., 2003; Kurissery
 2399 et al., 2012; Gonçalves, Rodrigues e Silva-Filho, 2017). A cafeína foi encontrada em todas as amostras
 2400 analisadas e suas concentrações tendem a subir nas áreas mais populosas, sugerindo a entrada contínua de
 2401 resíduos domésticos humanos no rio. De fato, a maior concentração de cafeína (1040 ng L⁻¹) foi observada
 2402 (DR5) próximo a área urbana, cidade de Dourados (218.000 habitantes) (IBGE, 2017). Portanto, a cafeína
 2403 pode ser usada como um possível indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais.

2404 O imidacloprido é um inseticida neonicotinóide usado em todo o mundo. Estudos ambientais
 2405 indicaram que o imidacloprido pode ser detectado em riachos ou rios (Fuentes et al., 2015; Pascual-Aguilar
 2406 et al., 2017). Nesta pesquisa, o imidacloprido foi quantificado em todos os locais do BR, com concentrações

2407 entre 16,3 a 53,5 ng L⁻¹ (Tabela 4). Segundo Smit et al. (2015) o imidacloprido tem potencial ecotóxico
2408 para os organismos aquáticos, assim, restrições no uso de produtos à base deste composto são importantes
2409 para reduzir a emissão nos recursos hídricos e proteger a vida aquática.

2410 A atrazina é amplamente utilizada para controlar múltiplas ervas daninhas e para aumentar a
2411 produção agrícola, contudo pode facilmente migrar para águas superficiais de campos agrícolas. Pesquisas
2412 realizadas em locais mostraram onde este herbicida é comumente utilizado podem indicar concentrações
2413 acima dos limites determinados pelas diretrizes da US EPA, 3 µg L⁻¹ (US EPA, 2014). A atrazina foi
2414 encontrada em todos os locais de amostragem do BR, com exceção no ponto 2. Estudos indicam que sua
2415 degradação gera metabólitos como a 2-hidroxiatrazina (Moreira et al., 2017, Hernández et al., 2015) que
2416 também foram determinados nos locais de amostragem, exceto para o ponto 2 do DR. O herbicida
2417 tebutiuron foi determinado no ponto 9 do DR e em alguns locais da BR. O tebutiuron apresenta alto
2418 potencial de lixiviação devido à sua longa meia-vida e alta solubilidade em água, sendo indicado para o
2419 controle de plantas daninhas principalmente no cultivo de cana-de-açúcar (Negrisoli, 2007), que é uma
2420 cultura amplamente distribuída próxima aos locais de amostragem.

2421 Assim como a cafeína, a contaminação dos recursos hídricos pelo bisfenol A pode ser atribuída às
2422 ações antrópicas realizadas em torno dos locais de amostragem. Durante a fabricação, uso, envelhecimento
2423 e eliminação de produtos contendo bisfenol A, a contaminação deste composto para o meio ambiente parece
2424 ser inevitável. Esse resultado gera uma séria preocupação, pois o bisfenol A tem múltiplos efeitos de
2425 disfunção endócrina, afetando particularmente a expressão de genes relacionados ao metabolismo dos
2426 esteróides, retinóides e prostaglandinas (Villeneuve et al., 2012; Ortiz-Villanueva et al., 2017).

2427

2428 *4.2 Análises moleculares*

2429 A ocorrência de contaminantes emergentes tem sido extensivamente monitorada, com amostras
2430 pontuais seguidas de análises laboratoriais em modelos animais tradicionais para avaliar o efeito potencial
2431 e o mecanismo de ação de substâncias químicas únicas. No entanto, análises químicas combinadas a
2432 bioensaios podem revelar o nível de poluição da água, uma vez que o impacto de misturas complexas reflete
2433 a situação ambiental, ao contrário dos compostos isolados. Os resultados do PCA definiram três misturas
2434 de CEs de acordo com a característica dos rios e foram utilizados para avaliar seu potencial transcricional
2435 em embriões de zebrafish.

2436 O gene *cat*, bem como a sua atividade enzimática associada, catalase, tem sido estudada como
2437 biomarcador do estresse oxidativo causado por herbicidas em peixes (Toni et al., 2010; Stara et al., 2012)
2438 e outros organismos presentes no ambiente aquático (Mofeed e Mosleh, 2013). A condição de estresse
2439 oxidativo está associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à diminuição das defesas
2440 antioxidantes, causando danos oxidativos em organismos expostos (Valavanidis et al., 2006). Componentes
2441 celulares, incluindo carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, podem ser danificados pela alta
2442 reatividade das EROs. Peixes, como muitos outros vertebrados, tentam reduzir os danos do estresse
2443 oxidativo usando um sistema de defesa antioxidante que consiste na produção de moléculas antioxidantes
2444 (Alvarez et al., 2005) e ativação da síntese de enzimas antioxidantes, como a catalase (Valavanidis et al.,
2445 2006).

2446 A mistura de pesticidas nos recursos hídricos é comum devido à prática dos produtores rurais. No
2447 entanto, apesar de algumas vantagens para os agricultores, o uso de misturas pode ampliar o efeito tóxico
2448 de componentes químicos em organismos aquáticos (Laetz et al., 2009; Prestes et al., 2011; Silva et al.,
2449 2015). Fatima et al. (2007) avaliaram os efeitos combinados de herbicidas, em concentrações presentes em
2450 corpos de água na Bélgica, sobre as atividades do gene *cat* em peixes expostos aos compostos. Os efeitos
2451 combinados dos herbicidas atrazine ($42 \mu\text{g L}^{-1}$), simazina ($41 \mu\text{g L}^{-1}$), diuron ($41 \mu\text{g L}^{-1}$) e isoproturon (47
2452 $\mu\text{g L}^{-1}$) diminuíram significativamente a atividade da CAT. A exposição da tilápia (*Oreochromis niloticus*)
2453 a misturas dos herbicidas amplamente utilizados na cultura da cana-de-açúcar: tebutiuron, diuron e
2454 hexazinona induziram alterações substanciais nas atividades enzimáticas do *cat*, uma resposta bem
2455 conhecida dos animais aquáticos à exposição a esses herbicidas (Van Der Kraak et al., 2014; Jonsson et al.,
2456 2017). Além disso, os herbicidas atrazina e hexazinona também mostraram ser responsáveis pela indução
2457 do estresse oxidativo, interferindo em diferentes desfechos e produção de ROS em algumas espécies de
2458 peixes (Valavanidis et al., 2006).

2459 O gene *cyp19a1b* do peixe-zebra codifica a aromatase cerebral (aromatase B) que é expressa
2460 apenas em células gliais radiais que atuam como progenitoras neuronais tanto em cérebro adulto quanto em
2461 desenvolvimento (Pellegrini et al., 2007). O gene *cyp19a1b* é um marcador bem conhecido para exposição
2462 a estrogênios, e é regulado tanto por estrogênios naturais e sintéticos (estradiol, estriol, estrona e
2463 etinilestradiol) quanto por compostos semelhantes ao estrogênio, como o BPA (Brion et al., 2012; Kah
2464 2013, Chen et al., 2017). Nossos dados são consistentes com a composição de nossas misturas de poluentes,
2465 estriol e bisfenol A, que contêm muitos dos compostos estrogênicos mencionados acima. Além de uma

2466 correlação mais fraca com outros compostos como 2-hidroxiatrazina, diuron, malathion, 17 α -
2467 etinilestradiol, fipronil, carbendazim e triclosan.

2468 Sabe-se que poluentes diferentes induzem actividade semelhante à dioxina através da via do
2469 receptor de hidrocarboneto de arila (AhR) (Hahn, 2001). Esta é a via primária de ativação do gene *cyp1a*,
2470 a contrapartida molecular do biomarcador clássico para a exposição a dioxinas e outras formas relacionadas
2471 de poluição orgânica, a etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) (Aguirre-Martínez et al., 2017 Bucheli e Fent,
2472 1995; Gokoyr e Forlin, 1992, Piña et al., 2007). É notável que nenhum dos compostos presentes em nossas
2473 misturas possa ser considerado um veDRadeiro agonista do receptor de hidrocarboneto de arila (AhR), o
2474 que provavelmente justifica a ativação relativamente baixa do gene nos testes. No entanto, vários grupos
2475 de pesquisa sugeriram que esses marcadores podem ser usados para monitorar a exposição de peixes a uma
2476 variedade de compostos orgânicos, incluindo produtos farmacêuticos, BPA, cafeína, diuron, entre outros
2477 (Goksoy e Husoy, 1992; Saeed et al., 2016; Aguirre -Martínez et al., 2017; Velki et al., 2017), o que seria
2478 consistente com nossos resultados.

2479

2480 **5. Conclusão**

2481 As amostras de água dos rios apresentaram baixas concentrações de CEs nos rios brasileiros
2482 monitorados, indicando possíveis efeitos nocivos ao meio ambiente. No entanto, em diferentes épocas do
2483 ano, com a intensificação das atividades agrícolas, pode haver maior contaminação por CEs nos recursos
2484 hídricos. Neste cenário, altas concentrações de CEs podem ter efeitos biológicos adversos para os
2485 organismos vivos, como demonstrado por alterações transcricionais nos genes *cat*, *cyp19a1b* e *cyp1a*,
2486 indicando efeitos do estresse dos CEs sobre o zebrafish. Portanto, uma avaliação de risco abrangente deve
2487 contemplar uma ampla gama de concentrações para avaliar os potenciais efeitos biológicos adversos para
2488 os organismos vivos.

2489 As atividades realizadas nos arredores dos rios mostraram ter influência no tipo de poluentes
2490 encontrados nos rios. Além disso, foi demonstrado que o modelo biológico in vivo, como o zebrafish, é
2491 uma ferramenta valiosa na avaliação de risco de misturas químicas.

2492

2493 **Agradecimentos**

2494 Os autores gostariam de agradecer a Cristiane Vidal e Raphael D'Anna Acayba pelas análises
2495 químicas na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Universidade Federal da Grande

2496 Dourados (UFGD) do Mato Grosso do Sul, Brasil e ao Instituto de Avaliação Ambiental e Pesquisa da
2497 Água do Conselho Espanhol de Pesquisa Científica (IDAEA-CSIC) de Barcelona, Espanha, para apoio
2498 logístico. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de
2499 Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul
2500 (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

2501

2502 **6. Referências**

2503 Aguirre-Martínez, G.V., ReinaDRy, H.C., Martín-Díaz, M.L., Henry, T.B. (2017). Response of gene
2504 expression in zebrafish exposed to pharmaceutical mixtures: Implications for environmental risk.
2505 *Ecotoxicology and Environ. Saf* 142, 471–479. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.04.038.

2506

2507 Abdelkader, T.S., Chang, S., Kim, T., Song, J., Kim, D.S., Park, J. (2013). Exposure time to caffeine affects
2508 heartbeat and cell damage-related gene expression of zebrafish *Danio rerio* embryos at early developmental
2509 stages. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1277–1283. doi: 10.1002/jat.2787. Epub 2012 Aug 9.

2510

2511 Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev*
2512 *Fish Biol. Fisher* 15, 75–88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>

2513

2514 Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., CaDRoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O. (2012). Screening
2515 estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b- GFP) zebrafish embryos.
2516 *PLoS One* 7, 360-69. doi: 10.1371/journal.pone.0036069.

2517

2518 Bucheli, T.D., Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental
2519 contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201–268.
2520 <https://doi.org/10.1080/10643389509388479>

2521

2522 Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H.R. (2003). Caffeine, an anthropogenic marker for
2523 wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 37, 691–700. doi: 10.1021/es020125z

2524

2525 Chen, J., Saili, K.S., Liu, Y., Li, L., Zhao, Y., Jia, Y., Bai, C., Tanguay, R.L., Dong, Q., Huang, C. (2017).
2526 Developmental bisphenol A exposure impairs sperm function and reproduction in zebrafish. *Chemosphere*
2527 169, 262-270. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.089.
2528
2529 Dai, Y.J., Jia, Y.F., Chen, N., Bian, W.P., Li, Q.K., Ma, Y.B., Chen, Y.L., Pei, D.S. (2014). Zebrafish as a
2530 model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 11–17. doi: 10.1002/etc.2406
2531
2532 EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2015. Precipitação esperada na Bacia do Rio
2533 Brilhante, MS. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41443/1/DOC-752005.pdf>.
2534 (Acessado 24 Novembro 2017).
2535
2536 Fatima, M., Mandiki, S. N., Douxfils, J., Silvestre, F., Coppe, P., & Kestemont, P. (2007). Combined effects
2537 of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish. *Immune and antioxidant*
2538 *effects. Aquatic Toxicology*, 81, 159–167. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.11.013.
2539
2540 Fuentes, E., Cid, C., Báez, M.E. (2015). Determination of imidacloprid in water samples via
2541 photochemically induced fluorescence and second-order multivariate calibration. *Talanta* 134, 8–15.
2542 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.017>.
2543
2544 Feitsma, H., Cuppen, E. (2008). Zebrafish as a cancer model. *Mol. Cancer Res.* 6, 685–694. doi:
2545 10.1158/1541-7786.MCR-07-2167.
2546
2547 Glisic, B., Hrubik, J., Fa, S., Dopudj, N., Kovacevic, R., Andric, N. (2014) Transcriptional profiles of
2548 glutathione-S-Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. *Environ*
2549 *Toxicol.* 31, 233-44. doi: 10.1002/tox.22038.
2550
2551 Gokoyr, A., Forlin, L. (1992). The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental
2552 monitoring. *Aquat. Toxicol.* 22, 287–312. doi: 10.1016/0166-445X(92)90046-P
2553

2554 Goksoyr, A., Husoy, A.M. (1992). The cytochrome P450 1A1 response in fish: application of
2555 immunodetection in environmental monitoring and toxicological testing. *Mar. Environ. Res.* 34, 147–150.
2556 [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90099-8)
2557
2558 Gonçalves, E.S., Rodrigues, S.V., da Silva-Filho, E.V. (2017). The use of caffeine as a chemical marker of
2559 domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil.
2560 *Rev. Ambient. Água* 12, 192-202. doi:10.4136/ambi-agua.1974
2561
2562 Guo, D., Wang, Y., Qian, Y., Chen, C., Jiao, B., Cai, L., Wang, Q. (2017) Joint acute and endocrine
2563 disruptive toxicities of malathion, cypermethrin and prochloraz to embryo-larval zebrafish, *Danio rerio*.
2564 *Chemosphere.* 166, 63-71. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.075.
2565
2566 Hahn, M. (2001). Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: insights from fish and other non-
2567 traditional models. *Mar. Biotechnol.* 3, 224–238. doi: 10.1007/s10126-001-0045-y
2568
2569 Hallare, A., Nagel, K., Kohler, H.R., Triebkorn, R. (2006). Comparative embryotoxicity and proteotoxicity
2570 of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol Environ Saf.* 63, 378–388. Doi:
2571 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.006>
2572
2573 Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D.,
2574 Stueve, T., Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male
2575 African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4612. doi:
2576 10.1073/pnas.0909519107.
2577
2578 Heberer, T. (2002). Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a
2579 review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
2580
2581 Hernández, F., Ibáñez, M., Portolés, T., Cervera, M.I., Sancho, J.V., López, F.J. (2015). Advancing
2582 towaDRs universal screening for organic pollutants in Waters. *J. of Hazardous Materials* 282, 86–95. doi:
2583 10.1016/j.jhazmat.2014.08.006.

2584

2585 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
2586 Censo Demográfico. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ms/dourados/panorama>. (Accessed 07 November
2587 2017).

2588

2589 Jiang, J., Wu, S., Wu, C., An, X., Cai, L., Zhao, X. (2014). Embryonic exposure to carbendazim induces
2590 the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio*
2591 *rerio*). *Fish & Shellfish Immunology* 41, 493-500. doi: 10.1016/j.fsi.2014.09.037.

2592

2593 Jiang, J., Wu, S., Wang, Y., An, X., Cai, L., Zhao, X., Wu, C. (2015). Carbendazim has the potential to
2594 induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae
2595 development. *Toxicology in Vitro*. 29, 1473–1481. doi: 10.1016/j.tiv.2015.06.003.

2596

2597 Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z. (2010) Oxidative stress response
2598 and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 78, 846-
2599 852. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.044.

2600

2601 Jolliffe, I.T.1., Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos.*
2602 *Trans. A Math Phys. Eng. Sci.* 13, 374. doi: 10.1098/rsta.2015.0202.

2603

2604 Jonsson, C.M., Arana, S., Ferracini, V.L., Queiroz, S.C.N., Clemente, Z., Vallim, J.H., Maia, A.H.N., de
2605 Moura, M.A.M. (2017). HeBRicide Mixtures from Usual Practice in Sugarcane Crop: Evaluation of
2606 Oxidative Stress and Histopathological Effects in the Tropical Fish *Oreochromis niloticus*. *Water, Air, &*
2607 *Soil Pollution* 9, 228:332. doi: 10.1007/s11270-017-3506-2

2608

2609 Kah, O. (2013). Brain aromatase and endocrine disruptors in zebrafish: from basic to applied research.
2610 *Endocrine Abstracts* 32, S9. Doi:10.1530/endoabs.32.S7.1

2611

2612 Kurissery, S., Kanavillil, N., Verenitch, S., Mazumder, A. (2012). Caffeine as an anthropogenic marker of
2613 domestic waste: a study from Lake Simcoe watershed. *Ecol. Indic.* 23, 501–8.
2614 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.05.001>
2615
2616 Kuster, M., López, de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D. (2008).
2617 Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage
2618 treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J.*
2619 *Hydrol.* 358, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.05.030>
2620
2621 Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T. K., Hebert, V., Stark, J. D., & Scholz, N. L. (2009). The synergistic
2622 toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific
2623 salmon. *Environmental Health Perspectives*, 117, 348–353. doi: 10.1289/ehp.0800096.
2624
2625 Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., Picó, Y. (2015). Pesticide monitoring in the basin
2626 of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Sci. of The Total Environ.* 503,
2627 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.095>
2628
2629 Matamoros, V., Rodríguez, Y., Albaigés, J. (2016). A comparative assessment of intensive and extensive
2630 wastewater treatment technologies for removing emerging contaminants in small communities. *Water Res.*
2631 88, 777-785. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.058.
2632
2633 Matthiessen, P. (2008). An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing
2634 internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. *Integr. Environ. Assess. Manage.* 4, 274.
2635 doi: 10.1897/IEAM_2008-003.1.
2636
2637 Message, H.J., Santos, D.A., Baumgartner, M.T., Affonso, I.P. (2016). Planícies de inundação a
2638 Biodiversidade do Rio Paraná ameaçada. *Ciência Hoje*, 334, 36-39.
2639
2640 Miller, J.C., Miller, J.N. (2005). *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*. Harlow, England.
2641

2642 Miodovnik, A., Engel, S.M., Zhu, C., Ye, X., Soorya, L.V., Silva, M.J., Calafat, A.M., Wolff, M.S. (2011).
2643 Endocrine disruptors and childhood social impairment. *Neurotoxicology*, 32, 261. doi:
2644 10.1016/j.neuro.2010.12.009.
2645
2646 Mofeed, J., & Mosleh, Y. Y. (2013). Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus*
2647 *obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. *Ecotoxicology and Environmental*
2648 *Safety*, 95, 234–240. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.05.023.
2649
2650 Montagner, C.C., JaDRim, W.F. (2011). Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine
2651 disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1452-1462
2652 <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000800008>
2653
2654 Montagner, C. C., Umbuzeiro, G.A., Pasquini, C., JaDRim, W.F. (2014) Caffeine as an indicator of
2655 estrogenic activity in source water. *Environ. Sci. Process. Impacts*, 16. doi: 10.1039/c4em00058g
2656
2657 Montagner, C.C., Vidal, C., Acayaba, R.D. (2017). Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do
2658 Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quim. Nova*, 40, 1094-1110.
2659 <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>.
2660
2661 Moreira, A.J., Pinheiro, B.S., Araújo, A.F., Freschi, G.P.G. (2017). Evaluation of atrazine degradation
2662 applied to different energy systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18502–18511.
2663 <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6831-x>
2664
2665 Negrisoli, E., Velini, E.D., Rossi, C.V.S., Correia, T.M., Costa, A.G.F. (2007). Associação do herbicida
2666 tebuthiuron com a cobertura de palha no controle de plantas daninhas no sistema de cana-crua. *Planta*
2667 *Daninha* 25, 621-628. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582007000300023>
2668
2669 Oppel, J., Broll, G., Loffler, D., Meller, M., Rombke, J., Ternes, T. (2004). Leaching behaviour of
2670 pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater
2671 protection. *Sci. Total Environ.* 328, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.004>

2672

2673 Ortiz-Villanueva, E., Navarro-Martin, L., Jaumot, J., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Pina, B., Tauler, R.
2674 (2017). Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated
2675 metabolomic and transcriptomic approach. *Environ. pollution* 231, 22-36. doi:
2676 10.1016/j.envpol.2017.07.095.

2677

2678 Pascual-Aguilar, J.A., Andreu, V., Campo, J., Picó, Y., Maisá, A. (2017). Pesticide occurrence in the waters
2679 of Júcar River, Spain from different farming landscapes. *Sci. of the Total Environ.* 607, 752-760.
2680 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.176>

2681

2682 Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M., Marmignon, M.H.,
2683 Brion, F., Pakdel, F., Kah, O. (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor
2684 cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501, 150–167. doi:
2685 10.1002/cne.21222

2686

2687 Piña, B., Casado, M., Quirós, L. (2007). Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and
2688 environmental monitoring. *Trends Anal. Chem.* 26, 1145-1154. doi:
2689 <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.009>

2690

2691 Pinto, P.I.S., Guerreiro, E.M., Power, D.M. (2013) Triclosan interferes with the thyroid axis in the zebrafish
2692 (*Danio rerio*). *Toxicol. Res.*, 2, 60-69. Doi: 10.1039/C2TX20005H.

2693

2694 Prestes, E. B., Jonsson, C. M., & Castro, V. L. S. (2011). Toxicity of formulations based on piraclostrobin,
2695 epoxiconazole and its combination on algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Pesticidas: Revista de*
2696 *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 21, 39–46. doi:10.5380/pes.v21i0.25943.

2697

2698 Raldua, D., Campos, B., Barata, C., Pina, B., Garcia, R.N., Babin, P.J. (2013). Deciphering emerging
2699 toxicological effects of pharmaceuticals on aquatic organisms by using *Daphnia magna* and *Danio rerio* as
2700 model organisms analysis. Removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle - occurrence

2701 and transformation in the environment. *Comprehensive Analytical Chemistry* 62, 611-47. doi:
2702 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62657-8.00017-3>
2703
2704 Raldua, D., Piña, B. (2014). In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity. *Expert Opinion on Drug*
2705 *Metabolism & Toxicology* 10, 685-697. doi: 10.1517/17425255.2014.896339.
2706
2707 RichaDRson, S.D., Ternes, T.A. (2018) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal*
2708 *Chem.* 90, 398-428. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04577.
2709
2710 Saeed, A., Hashmi, I., Zare, A., Mehrabani-Zeinabad, M., Achari, G., Habibi, H.R. (2016). Efficacy of UV-
2711 C photolysis of bisphenol A on transcriptome alterations of genes in zebrafish embryos. *J. Environ. Sci.*
2712 *Health A Tox. Hazadr Subst. Environ. Eng.* 18, 877-83. doi: 10.1080/10934529.2016.1191296.
2713
2714 Silva, E., Daam, M. A., & Cerejeira, M. J. (2015). Predicting the aquatic risk of realistic pesticide mixtures
2715 to species assemblages in Portuguese river basins. *Journal of Environmental Sciences*, 31, 12–20.
2716 doi:10.1016/j.jes.2014.11.006.
2717
2718 Smit, C.E., Posthuma-Doodeman, C.J.A.M., Van, V. P.L.A., De Jong, F.M.W. (2015). Ecotoxicity of
2719 Imidacloprid to Aquatic Organisms: Derivation of Water Quality StandadrS for Peak and Long-Term
2720 Exposure. *Human and Ecological Risk Assessment* 21, 1608–1630.
2721 <https://doi.org/10.1080/10807039.2014.964071>
2722
2723 Stara, A., Machova, J., & Velisek, J. (2012). Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and
2724 antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Environmental Toxicology and Pharmacology*,
2725 33, 334–343. doi:10.1016/j.etap.2011.12.019.
2726
2727 Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*
2728 166, 145–167. doi 10.1002/jpln.200390023
2729

2730 Toni, C., Menezes, C. C., Loro, V. L., Clasen, B. E., Cattaneo, R., Santi, A., Pretto, A., Zanella, R.,
2731 Leitemperger, J. (2010). Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide
2732 bispyribac-sodium. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 590–595. doi:10.1002/jat.1530.
2733
2734 Tran, S., Fulcher, N., Nowicki, M., Desai, P., Tsang, B., Facciol, A., Chow, H., Gerlai, R.B. (2017). Time-
2735 dependent interacting effects of caffeine, diazepam, and ethanol on zebrafish behaviour. *Progress in Neuro-*
2736 *Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 75, 16-27. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.12.004
2737
2738 USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2014. Atrazine Ecological Exposure
2739 Monitoring Program Data. Document ID: EPA-HQ-OPP-2003-0367-0303. (Acessado 05 Março 2018).
2740
2741 Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative
2742 stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–
2743 189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
2744
2745 Van Der Kraak, G.J., Hosmer, A.J., Hanson, M.L., Kloas, W., Solomon, K.R. (2014). Effects of atrazine in
2746 fish, amphibians, and reptiles: an analysis based on quantitative weight of evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 5,
2747 1-66. doi: 10.3109/10408444.2014.967836.
2748
2749 Velki, M., Meyer-Alert, H., Seiler, T., Hollert, H. (2017). Enzymatic activity and gene expression changes
2750 in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. *Aquatic toxicology* 193, 1-42.
2751 doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.019>.
2752
2753 Villeneuve, D.L., Garcia-Reyero, N., Escalon, B.L., Jensen, K.M., Cavallin, J.E., Makynen, E.A., Durhan,
2754 E.J., Kahl, M.D., Thomas, L.M., Perkins, E.J., Ankley, G.T. (2012). Ecotoxicogenomics to support
2755 ecological risk assessment: a case study with bisphenol A in fish. *Environ. Sci. Technol.* 46, 51–59. doi:
2756 10.1021/es201150a.
2757

2758 Xu, J., Chen, W., Wu, L., Green, R., Chang, A.C. (2009). Leachability of some emerging contaminants in
2759 reclaimed municipal wastewater-irrigated turf grass field. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1842–1850. doi:
2760 10.1897/08-471.1.
2761
2762 Zhang, C.J., Willett, C., Fremgen, T. (2003). Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Curr.*
2763 *Protoc. Toxicol.* 1–7. doi: 10.1002/0471140856.tx0107s17.
2764
2765 Zhao, F., Wei, P., Wang, J., Yu, M., Zhang, X., Tian, H., Wang, W., Ru, S. (2017). Estrogenic effects
2766 associated with bisphenol a exposure in male zebrafish (*Danio rerio*) is associated with changes of
2767 endogenous 17 β -estradiol and gene specific DNA methylation levels. *General and Comparative*
2768 *Endocrinology* 252, 27-35. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.07.032
2769
2770 Zhou, Y., Huang, H., Zhang, K., Ding, X., Jia, L., Yu, L., Zhu, G., Guo, J. (2016) miRNA-216 and miRNA-
2771 499 target cyb561d2 in zebrafish in response to fipronil exposure. *Environmental Toxicology and*
2772 *Pharmacology.* 45, 98–107. doi: 10.1016/j.etap.2016.05.019.
2773
2774 WiBRisky, S.E., Weber, G.J., Sepúlveda, M.S., Lin, T., Jannasch, A.S., Freeman, J.L. (2016). An
2775 embryonic atrazine exposure results in reproductive dysfunction in adult zebrafish and morphological
2776 alterations in their offspring. *Sci Rep.* 6, 1-13. doi: 10.1038/srep21337
2777
2778
2779
2780
2781
2782
2783
2784
2785
2786
2787

2788 **INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR**

2789

2790 **Contaminantes emergentes em rios brasileiros: ocorrência e efeitos na expressão gênica em**
2791 **embriões de zebrafish (*Danio rerio*)**

2792

2793 Juliana C. V. Sposito^a, Cassiana C. Montagner^b, Marta Casado^c, Laia Navarro-Martín^c, Julio César Jut
2794 Solórzano^d, Benjamin Piña^e, Alexeia B. Grisolia^e

2795

2796 ^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD,
2797 Dourados, MS, Brasil.

2798 ^b Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas,
2799 Campinas, São Paulo, Brasil.

2800 ^c Departamento de Química Ambiental, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Espanha.

2801 ^d Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul / UEMS, Dourados, MS, Brasil.

2802 ^e Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados / UFGD,
2803 Dourados, MS, Brasil.

2804 Autor correspondente. E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br. Número de telefone: +55 (67) 34102223.

2805

2806

2807

2808

2809

2810

2811

2812

2813

2814

2815

2816

Tabela 1 LC-MS/MS parâmetros experimentais para cada composto.

Compostos	Tipo de substância e grupo químico	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Modo ESI	Produção (m/z)			Energia de colisão (eV)			Abundância relativa (%)		Parâmetros instrumentais	Coeficiente de determinação (R ²)
												LDI (pg)		
Cafeína	Estimulante alcalóide	3.091	195.1	(+)	138.1	110.1	69.1	15	20	20	31.7	12.0	15	0.988
Imidacloprido	Inseticida neonicotinóide, medicamento veterinário	1.185	256.0	(+)	208.9	175.1		10	15		7.5		25	0.922
Carbendazim	Fungicida	2.324	192.1	(+)	160.1	132.1	105.1	20	30	35	24.9	18.8	5	0.985
Atrazina	Herbicida	5.877	216.2	(+)	174.1	103.9		15	15		17.4		5	0.851
2-hydroxyatrazina	Pesticida	3.091	198.2	(+)	156.2	114.1	86.1	15	20	20	40.3	66.4	5	0.991
Carbofurano	Pesticida	4.491	222.0	(+)	165.0	123.0	55.0	10	20	16	22.0	15.3	5	0.988
Hezaxinona	Herbicida	5.071	253.2	(+)	171.1	85.1	71.1	8	30	31	80.4	53.2	5	0.992
Tebutiuron	Herbicida	5.243	229.1	(+)	172.1	116.1	57.2	10	30	34	56.8	41.7	5	0.944
Diuron	Pesticida	6.245	233.0	(+)	72.1	72.1	46	20	20	16	35.6	99.4	5	0.855
Clomazona	Herbicida	6.706	240.1	(+)		125.0			1		---		5	0.870
Ametryn	Herbicida	6.877	228.2	(+)	186.1	158.1	138.1	15	20	20	14.9	22.9	5	0.928
Malathion	Inseticida organofosforado, medicamento veterinário	7.380	331.0	(+)	285.0	99.0		1	15		0.4		5	0.918
Tebuconazole	Fungicida	9.098	308.2	(+)	124.9	70.0	70.0	30	10	20	2.1	15.0	5	0.991
Testosterona	Homônio farmacêutico/natural, andrógeno	8.092	289.3	(+)	109.1	97.1	79.1	25	20	20	77.8	2.5	5	0.983
Progesterona	Homônio farmacêutico/natural, progesterona	10.335	315.3	(+)	109.1	97.2	79.2	15	25	30	63.0	7.7	5	0.992
17α-ethinylestradiol	Farmacêutico, xenoestrogênio	6.058	295.0	(-)	158.9	144.9	143.0	30	30	40	79.1	69.6	250	0.707
Bisfenol A	Plasticida	5.562	227.0	(-)	210.9	132.9		30	25		82.8		50	0.953
Estriol	Metabólito	4.448	287.0	(-)	170.9	144.9	143.0	30	35	40	91.6	53.9	75	0.994
Fipronil	Inseticida, medicamento veterinário	6.618	434.9	(-)	330.0	250.0	183.0	10	15	30	19.7	9.1	25	0.987
Octilfenol	Químico industrial	8.074	205.0	(-)	132.0	106.0		25	15		1.0		5	0.967
Triclosan	Antibacteriano e antifúngico	6.849	287.0	(-)	35.1	37.1		5	5		37.8		75	0.994

2819

Tabela 3 Sequências de pares de primers usados na PCR quantitativa em tempo real.

Gene alvo	Sequência dos primers (5' - 3')	Número de acesso
<i>ppia2</i>	F: GGGTGGTAATGGAGCTGAGA R: AATGGACTTGCCACCAGTTC	AY391452.1
<i>cyp1a</i>	F: GGTAAAGTTCACCGGGATGC R: CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG	NM_131879.2
<i>hsp70</i>	F: TCCCGCAGATCGAAGTGAC R: GTTTCCGGTGCTTTTGTC	NM_001113589.1
<i>cat</i>	F: CTGGCGTTTGATCCCAGTAAC R: CGATGGCGATGTGTGTCTG	NM_130912.2
<i>sod1</i>	F: CAATGCTAACTTTGTCAGGCCA R: CCTTCCCAAGTCATCCTCC	NM_131294.1
<i>tsh</i>	F: GTGTGCCCCACTGACTACA R: CCCTGGAGAAACAGAAGCCC	NM_181494.2
<i>cyp19a1a</i>	F: CGAATTCTTCTCAAACCCAAT R: CCGAACGGCTGGAAGAAAC	NM_131154.3
<i>cyp19a1b</i>	F: CAAAAACCCAACGAATTCAGC R: GGACCACAACCGAATGGCT	NM_131642.2
<i>cpy26b1</i>	F: GCTGTCAACCAGAACATTCCC R: GGTTCTGATTGGAGTCGAGGC	NM_212666.1
<i>casp8</i>	F: ACTAGCAAGCAAGCCCAAGC R: CCATCCGACGTCCAAACAC	NM_131510.2
<i>sox2</i>	F: CGGAGGTGCAGGACCAGA R: TCGTCGTACCGGGCACA	NM_213118.1
<i>cyb561d2</i>	F: TGTCAACTCCAGCACATCAAATTTA R: ATTGGGAAGAAAAAGGGTTATTCA	NM_001006102.1
<i>thrb</i>	F: AGCTCTTTCCGCCCTCTT R: TTGGTGTGGTGGGAGCAG	NM_131340.1

2820

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI); Número de seqüência de

2821

referência.

2822

2823

2824

2825

2826

2827

2828

2829

2830

2831

2832

2833

2834

2835

2836

2837 **Considerações finais**

2838 Os resultados do presente estudo indicaram a influência do uso e cobertura do solo
2839 na contaminação dos recursos hídricos por CEs, metais e alterações nas condições físico-
2840 químicas da água. Além disso foi possível verificar que a qualidade da água dos rios pode
2841 estar comprometida, por apresentar potencial citotóxico e genotóxico nos organismos
2842 expostos.