



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
LICENCIATURA INTEGRADA EM BIOLOGIA E QUÍMICA**

KAMILA LOUREIRO MACHADO

**A INFLUÊNCIA DO MERCÚRIO NA DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DA BACIA DO RIO
TAPAJÓS, PARÁ, BRASIL**

Santarém
2019

KAMILA LOUREIRO MACHADO

**A INFLUÊNCIA DO MERCÚRIO NA DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DA BACIA DO RIO
TAPAJÓS, PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura Integrada em Biologia e Química da Universidade Federal do Oeste do Pará, para a obtenção do grau de Licenciada em Biologia; Universidade Federal do Oeste do Pará; Instituto de Ciências da Educação.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho

Santarém
2019

KAMILA LOUREIRO MACHADO

**A INFLUÊNCIA DO MERCÚRIO NA DIVERSIDADE
GENÉTICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DA BACIA DO RIO
TAPAJÓS, PARÁ, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura Integrada em Biologia e Química da Universidade Federal do Oeste do Pará, para a obtenção do grau de Licenciada em Biologia; Universidade Federal do Oeste do Pará; Instituto de Ciências da Educação.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho

Conceito: *Aprovada*

Data de Aprovação 29/11/2019

Gabriel Iketani Coelho

Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho – Presidente/Orientador
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA

Luís Reginaldo R. Rodrigues

Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues - 1º examinador
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA

Ricardo Bezerra de Oliveira

Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira - 2º examinador
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA

Dedico este trabalho à minha família e a todos professores que um dia não mediram esforços para disseminar o legado desta linda profissão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que mesmo eu não merecendo, me ama e cuida de mim, pois durante todo meu percurso acadêmico sempre me honrou, principalmente quando eu pensava em desistir ele colocava pessoas boas para me acalantar, sou grata a ti meu Deus por esse amor incondicional.

A meus pais Claudomiro Santos Machado e Leila Loureiro Machado por nunca desistirem da minha educação, nunca me negaram nada, se a justificativa fosse o estudo, assim como meus irmão Cleomir, Glenda, Glenna e Kléverth, que mesmo do pouco que tinham, me ajudaram um dia financeiramente. Da mesma forma agradeço meu noivo Felipe Barros por me amar e ser paciente, e que junto à sua família me deram todo apoio necessário nesta cidade.

Ao Laboratório de Educação e Evolução Prof. Horácio Schneider – LEDEVO, em especial ao meu orientador e amigo professor Gabriel Iketani (não gosta do Coelho, rs) por acreditar e confiar em mim, tanto em pesquisa de laboratório (PIBIC) como em sala de aula (PIBID), ambas as oportunidades me trouxeram até aqui. Agradeço também pela infinita paciência, pelos risos, pelos lanches da tarde (às vezes) e por me proporcionar a alegria de conhecer e conviver com a Luciana Pimentel, excelente professora e como pessoa possui grande qualidade – prestatividade –, e com os meninos Lucas e Davi, sinto um carinho enorme por sua família.

Aos meus amigos de longa data, Hulda Karen, Talissa, Alcimery, João, que mesmo distantes se fizeram presente nesta jornada, assim como os casais e amigos próximos Joel&Josi, Hugo&Vi, Henrique&Alessandra, Pim&Angelina.

Aos meus amados, companheiros e amigos de curso, Kelly Duarte, Jaqueline Melo, Lucas Esteves, Naíze Pimentel, Robeca (Roberta e Rebeca), guardo vocês no coração e admiro cada um e aos meus colegas do LEDEVO, Ezequias Torres, Ariane Nicaretta, Danna Moraes, Rosa Illana, Antônio Vítor, Ellen Fernanda e Pedro Teodósio, obrigada por tirarem PCR do termociclador, DNA da incubadora, encherem rack de ponteiras, e principalmente por tornarem o ambiente acadêmico mais leve e espontâneo, principalmente a Danna, nunca vou esquecer o que cada um fez por mim. Agradeço também ao Laboratório de Genética e Biodiversidade, em nome do Professor Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues e da mestrandia Karen Auzier pelo suporte laboratorial, assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, juntamente com o Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia e Projeto Adaptações da Biota Aquática da Amazônica, pelo financiamento.

A todos os professores que tive em Terra Santa, Parintins e Santarém, sou eternamente grata por tudo.

RESUMO

O ecossistema Amazônia é caracterizado por sua grande diversidade ambiental, resultante da extensa área de floresta e ampliada pelos diferentes corpos hídricos, atores que juntos, reúnem todos os recursos naturais que tanto atraem olhares para região. Um desses recursos é adquirido através da mineração que dentre os diversos impactos ambientais destacamos a liberação de mercúrio (Hg) por meio de um dos processos de produção. O Hg é um dos metais pesados com maior toxicidade, tendo propriedades bioacumulativas e potencial genotóxico. Portanto, é importante avaliar os efeitos genotóxicos relacionados a esse metal, e uma forma de avaliar tais efeitos é através do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), técnica que amplifica segmentos aleatórios do DNA genômico total. Este estudo analisou os efeitos da poluição por Hg sobre *H. malabaricus* (traíra) em três localidades da bacia do rio Tapajós, Crepori, Juá e Parauá, para avaliar o possível impacto ambiental sobre a diversidade genética das populações desta espécie. Os resultados apontam que quanto maior a exposição ao Hg, maior o número de bandas, pois Crepori é a população com amostras de maiores concentrações de mercúrio total (HgT).

Palavras chaves: Amazônia. Ecotoxicologia. Metal pesado. RAPD.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO ÚNICO: A INFLUÊNCIA DO MERCÚRIO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCH,1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO BAIXO AMAZONAS, PARÁ, BRASIL	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 AMOSTRAGEM.....	12
2.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	12
2.2.1 Extração de DNA.....	12
2.2.2 Reações de RAPD:	13
2.2.3 Eletroforese e fotodocumentação:	13
2.3 ANÁLISE DOS DADOS	13
3 RESULTADOS	14
3.1 ANÁLISE DAS MISTURAS DE DNA.....	14
3.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS.....	17
4 DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Amazônia é caracterizado por sua grande diversidade ambiental e importância para os demais ecossistemas brasileiros, resultante da extensa área de floresta tropical e ampliada pelos diferentes tipos de água, como por exemplo, as águas pretas do rio Negro, as brancas do rio Amazonas e as claras do rio Tapajós, fatores que juntos, reúnem todos os recursos naturais que tanto atraem olhares para região (Val et al. 2010).

A exploração desses recursos, principalmente por meio do extrativismo, além de trazer desenvolvimento econômico e social para a região, traz também o descarte de substâncias químicas contaminantes que tornam os ecossistemas aquáticos como principais depósitos destas, que mesmo não sendo lançadas diretamente nos corpos de água têm seu destino final ali, devido aos processos físico-químicos que realizam (Oliveira Ribeiro 1997). O Hg por exemplo, é uma dessas substâncias, e dentre todos os metais pesados lançados no ambiente é o que tem maior potencial toxicológico (Lopes-Poleza 2004) e na forma de metilmercúrio (MeHg) é considerado uma substância com alta capacidade genotóxica devido à sua bioacumulação nos organismos vivos, tendo como principal alvo o sistema nervoso central (WHO 1990).

Atualmente, reconhecemos duas fontes principais de Hg para os ecossistemas: as fontes naturais e antrópicas (Lacerda et al. 2007). Para Marins et al. (2004), a primeira ocorre por meio de processos naturais como a ressuspensão de partículas do solo pelos ventos, erupções vulcânicas, queimadas de florestas e erupções do solo e águas superficiais e a fonte antrópica, segundo Siqueira e Aprille (2012), está diretamente associada à atividade mineradora, principalmente ao processo de produção de amálgama para recuperação do ouro de granulação fina, que por sua vez é queimado, geralmente ao ar livre, liberando o Hg para a atmosfera na forma de vapor (Hg^0).

A grande expansão da atividade mineradora iniciou-se na década de 1970, com o Plano de Integração Nacional, e teve seu auge entre as décadas de 1980 e 90, especialmente no Estado do Pará, próximo aos municípios de Itaituba, Jacareacanga e Eldorado dos Carajás e atualmente, Portanto, em vista de um possível aumento na atividade mineradora na região, é natural acreditar que algumas dessas substâncias liberadas no ambiente se acumulem nas espécies que compõem as cadeias tróficas, principalmente nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos (Rabello-Gay, Rodrigues, Monteleone-Neto 1991).

Organismos aquáticos podem ser úteis em estudos de avaliações ambientais, pois estão constantemente expostos a diversas substâncias tóxicas lançadas no ambiente. Os peixes, por ocuparem diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos

são considerados organismos chave para o biomonitoramento em estudos de ecotoxicologia. Esses animais, têm a capacidade de absorver moléculas toxicantes por diversas vias, como alimentação, pelas brânquias através da difusão simples de íons metálicos, pela água ingerida e pela adsorção direta através da pele, o que pode levar a respostas fisiológicas em diversos sistemas biológicos causadas por alterações físico-químicas da água e presença de poluentes aquáticos (Jesus e Carvalho 2008; Freitas e Siqueira-Souza 2009; Arrifano 2016). Outro fator importante no uso de peixes como organismos-teste é a semelhança fisiológica e histológica do seu organismo com o de outros vertebrados, inclusive o do homem (Dagostim 2014).

A espécie *H. malabaricus* (Bloch, 1794), por exemplo, também conhecida popularmente como traíra, possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e está amplamente distribuída nas bacias hidrográficas da América do Sul (Hensley e Moody 1975). A traíra é um peixe predador topo de cadeia trófica e de fácil manuseio em laboratório. Mesmo não sendo considerada um organismo modelo para testes ecotoxicológicos, muitos autores já a utilizaram, em estudos *in vivo*, como organismo teste para a avaliação dos efeitos dos mais diversos tipos de poluentes (Cestari et al. 2004; Ferraro et al. 2004; Ramsdorf et al. 2009; Silva et al. 2011; Mela et al. 2014).

Segundo Mitchelmore e Chipman (1998), a genotoxicidade é a capacidade de uma substância tóxica provocar danos à molécula de DNA, podendo ser diretos, causando mutações no DNA (efeito mutagênico) ou indiretos através de alterações ambientais que podem ter efeitos fisiológicos e/ou ecológicos que levam ao aumento da mortalidade ou que afetam a capacidade reprodutiva da população sujeita ao poluente (de Wolf et al. 2004).

Uma forma de avaliar tais efeitos é através do uso de ferramentas moleculares, principalmente utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), como por exemplo o Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) que vem sendo bastante utilizado, afinal, é um processo que envolve a amplificação aleatória de segmentos do DNA genômico (gDNA) através da PCR (Atienzar et al. 2002; Zhiyi e Haowen 2004).

Esta técnica relaciona efeitos genéticos da população considerando diferenças de intensidade da banda ou ganho/perda de bandas RAPD, mas também podem fornecer informações sobre a diversidade genética geral e estrutura das populações, nos permitindo a comparação entre áreas com diferentes níveis de contaminação. Por outro lado, devido à sua alta sensibilidade às condições de PCR e sua amplificação aleatória, a reprodutibilidade continua sendo sua principal desvantagem (Zhiyi e Haowen 2004; de Wolf et al. 2004).

OBJETIVOS

Geral: Investigar possíveis efeitos da contaminação por Hg sobre a diversidade genética de *H. malabaricus* (Traíra) em três localidades da bacia do rio Tapajós- Crepori, Juá e Parauá.

Específicos:

- Testar o RAPD como marcador em ecotoxicologia para populações da bacia do rio Tapajós;
- Obter bandas das populações em estudo;
- Obter bandas de amostras individuais com diferentes concentrações de HgT.

**CAPÍTULO ÚNICO: A INFLUÊNCIA DO MERCÚRIO NA
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hoplias malabaricus* (BLOCH,1794)
(CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) DO BAIXO AMAZONAS,
PARÁ, BRASIL**

Kamila Loureiro Machado¹. Gabriel Iketani²

Em preparação para submissão à revista Environmental Science and Pollution Research³

RESUMO

A região Amazônica, pela vasta diversidade de recursos naturais que possui, é alvo de inúmeras atividades extrativistas que direta ou indiretamente liberam substâncias químicas poluentes ao ambiente, por isso, é importante avaliar se já são observados efeitos genotóxicos relacionados a estas. Portanto, o objetivo do trabalho foi analisar os possíveis efeitos genotóxicos da poluição por mercúrio (Hg) sobre *H. malabaricus* (traíra) em três localidades da bacia do rio Tapajós (Crepori, Juá e Parauá) a fim de avaliar o possível impacto ambiental sobre a diversidade genética das populações desta espécie. O marcador genético utilizado foi o RAPD e se mostrou útil e prático ao detectar a genotoxicidade. Apesar de ser a primeira vez em que se utiliza este marcador para investigar possíveis danos ao DNA, causado por Hg, em *H. malabaricus* de ambientes naturais do baixo Amazonas, conseguimos ultrapassar o maior gargalo da técnica, a reprodutibilidade e os resultados apontam que quanto maior a exposição ao Hg, maior o número de bandas, pois Crepori é a população com amostras de maiores concentrações de mercúrio total (HgT)

Palavras chaves: Amazônia. Ecotoxicologia. Metal pesado. RAPD. Traíra.

¹ Universidade Federal do Oeste do Pará, Av. Marechal Rondon, Santarém, Pará, Brasil

² Universidade Federal do Oeste do Pará, Av. Marechal Rondon, Santarém, Pará, Brasil

Autor correspondente: kmyla_machado@hotmail.com. Cel. +5593991168489

³ Normas para submissão em: <https://www.springer.com/journal/11356/submission-guidelines?IFA>

1 INTRODUÇÃO

Um dos metais pesados lançados ao ambiente com maior potencial toxicológico é o Hg (Lopes-Poleza 2004) e na forma de metilmercúrio (MeHg) é considerado uma substância com alta capacidade genotóxica devido à sua bioacumulação nos organismos vivos, tendo como principal alvo o sistema nervoso central (WHO 1990). Atualmente, reconhecemos duas fontes principais de Hg para os ecossistemas: as fontes naturais e antrópicas (Lacerda et al. 2007). Segundo Siqueira e Aprille (2012), a fonte antrópica, está diretamente associada à atividade mineradora, principalmente ao processo de produção de amálgama para recuperação do ouro de granulação fina, que por sua vez é queimado, geralmente ao ar livre, liberando o Hg para a atmosfera na forma de vapor (Hg^0).

Devido a sua alta toxicidade e à acumulação em organismos aquáticos, particularmente em peixes, o Hg tornou-se um dos poluentes mais importantes e também um dos mais estudados (Brabo, 2010). Os peixes, por ocuparem os diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos e estão constantemente expostos às diversas substâncias tóxicas lançadas no ambiente, além da semelhança fisiológica e histológica do seu organismo com o de outros vertebrados, inclusive o do homem, desta forma, são considerados organismos chave para o biomonitoramento em estudos de ecotoxicologia, (Jesus e Carvalho, 2008; Freitas e Siqueira-Souza, 2009; Arrifano, 2016; Dagostim 2014)

A espécie *H. malabaricus* (Bloch, 1794), por exemplo, também conhecida popularmente como traíra, pode ser considerada um bioindicador, pois possui grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e está amplamente distribuída nas bacias hidrográficas da América do Sul (Hensley e Moody 1975) e por ser predador de topo de cadeia trófica e de fácil manuseio em laboratório, diversos trabalhos têm sido realizados com essa espécie para a avaliação dos efeitos genotóxicos dos mais diversos tipos de poluentes em estudos *in vivo* (Cestari et al. 2004; Ferraro et al. 2004; Ramsdorf et al. 2009; Silva et al. 2011; Mela et al. 2014).

Segundo Mitchelmore e Chipman (1998), a genotoxicidade é a capacidade de uma substância tóxica provocar danos à molécula de DNA, esses danos podem ser diretos, causando mutações no DNA (efeito mutagênico) ou indiretos através de alterações ambientais que podem ter efeitos fisiológicos e/ou ecológicos que levam ao aumento da mortalidade ou que afetam a capacidade reprodutiva da população sujeita ao poluente (de Wolf et al. 2004). Uma forma de avaliar tais efeitos é através do uso de ferramentas moleculares, estas são muito utilizados em estudos com marcadores moleculares e taxonomia de espécies, principalmente a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Em estudos de ecotoxicologia, os Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso (*Random Amplified*

Polymorphic DNA - RAPD) vêm sendo bastante utilizados, pois é uma técnica que envolve a amplificação de segmentos aleatórios do DNA genômico (gDNA) através da PCR (Atienzar et al. 2002; Zhiyi e Haowen 2004).

Esta técnica relaciona efeitos genéticos da população considerando diferenças de intensidade da banda ou ganho/perda de bandas RAPD, mas também podem fornecer informações sobre a diversidade genética geral e estrutura das populações, nos permitindo a comparação entre áreas com diferentes níveis de contaminação sem precisar obter dados de sequência. Por outro lado, devido à sua alta sensibilidade às condições de PCR e sua amplificação aleatória, a reprodutibilidade continua sendo sua principal desvantagem (Zhiyi e Haowen 2004; de Wolf et al. 2004). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da poluição por Hg sobre a diversidade genética da traíra (*H.malabaricus*) em três localidades do baixo Amazonas (Crepuri, Juá e Parauá) através da técnica de RAPD.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas amostras de tecido muscular de *H. malabaricus* previamente coletadas em três regiões da bacia do rio Tapajós: área 1 (CRP) - Comunidade garimpeira do Creporizão, rio Crepori, município de Itaituba (PA), (n=16), situado em 6° 49' 9.96"S e 56° 50' 51.26"O; área 2 (JUA) - Lago Juá, situado na margem direita do rio Tapajós, município de Santarém (n=20), situado em 2° 26' 17.15"S e 54° 47' 7.43"O e área 3 (PAR) - Vila Parauá, localizada na margem esquerda do baixo rio Tapajós, área pertencente à Reserva Extrativista (REsEx) Tapajós – Arapiuns, município de Santarém (n=20), situada em 2° 48' 8.1"S e 55° 10' 41.4"O.

Todos os tecidos utilizados fazem parte do banco de tecidos do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBIO) e foram gentilmente cedidos pelo Coordenador do mesmo, Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

2.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

2.2.1 Extração de DNA: O DNA genômico total (gDNA) foi extraído por precipitação em Acetato de Amônia (Bruford et al. 1992). Amostras de DNA de 56 indivíduos foram combinadas em duas misturas de 10 por área (*pool*), com exceção da área 1 que contou com um *pool* de 10 e outro com 6, a escolha dos DNA para a constituição dos *pools* foi aleatorizada. Este procedimento foi adotado afim de suprimir eventuais efeitos do polimorfismo intrapopulacional que potencialmente serão revelados pela técnica de Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD). As amostras de gDNA foram quantificadas em espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotecnologia) e

padronizadas para uma concentração de 50 ng/ μ L conforme previamente adotado para *Danio rerio* e *Rutilus rutilus* (Zhiyi e Haowen, 2004; Bem Salem 2014). Além das análises das misturas, realizamos análise individual com amostras três amostras de menor concentração de HgT e três de maior, para Crepori e Juá, a fim de observar se há padrão de acordo com o gradiente numérico, segundo a quantificação feita por Silva (2017), que variaram de 0,39 a 2,19 mg.Kg⁻¹ em amostras de crepori e 0,23 a 0,64 mg.Kg⁻¹ em amostras do lago do Juá.

2.2.2 Reações de RAPD: Foram testados 14 oligonucleotídeos com três repetições (Eurofins, Kit A). Foram selecionados seis oligonucleotídeos que mostraram as melhores ampliações (tabela 1).

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos com melhores ampliações

Oligonucleotídeo	Sequência
A1	5' –CAGGCCCTTC– 3'
A3	5' –AGTCAGCCAC– 3'
A4	5' –AATCGGGCTG– 3'
A5	5' –AGGGGTCTTG– 3'
A10	5' –GTGATCGCAG– 3'
A13	5' –CAGCACCCAC– 3'

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

As reações de RAPD foram constituídas por: 4 μ L de dNTPs (1,25mM), 2,5 μ L de tampão 10X, 2,5 μ L de MgCl₂, 0,3 μ L de *Taq* polimerase (5U/ μ L) (Ludwig Biotec), 1,5 μ L de oligonucleotídeo (10 μ M), 1 μ L da mistura de gDNA à 50ng/ μ L e água de injeção para completar o volume final de 25 μ L. O programa de ciclagem consistiu em uma etapa de desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 36°C, e 5 minutos a 72°C, finalizando com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

2.2.3 Eletroforese e fotodocumentação: Os produtos amplificados foram visualizadas após eletroforese em gel de agarose a 1% com TBE 1X (preparado a partir de uma solução estoque de TBE 10x, contendo Tris – Base 99,9%, EDTA 99,0% e Ácido Bórico 99,5%), submetido a eletroforese a 120V, 400mA por 110 minutos. Para cada gel foram aplicadas 15 μ L do produto RAPD e 8 μ L de corante (Blue juice e GelRed) e para a quantificação dos fragmentos amplificados utilizou-se 2 μ L do marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Ludwig Biotec) corado com GelRed (Biotium). Os géis foram visualizados e digitalizados em fotodocumentador L–Pix (Loccus Biotecnologia).

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos resultados tanto das misturas de DNA quanto das amostras individuais de CRP e JUA foram realizadas de acordo com modificações das duas etapas propostas por Zhiyi

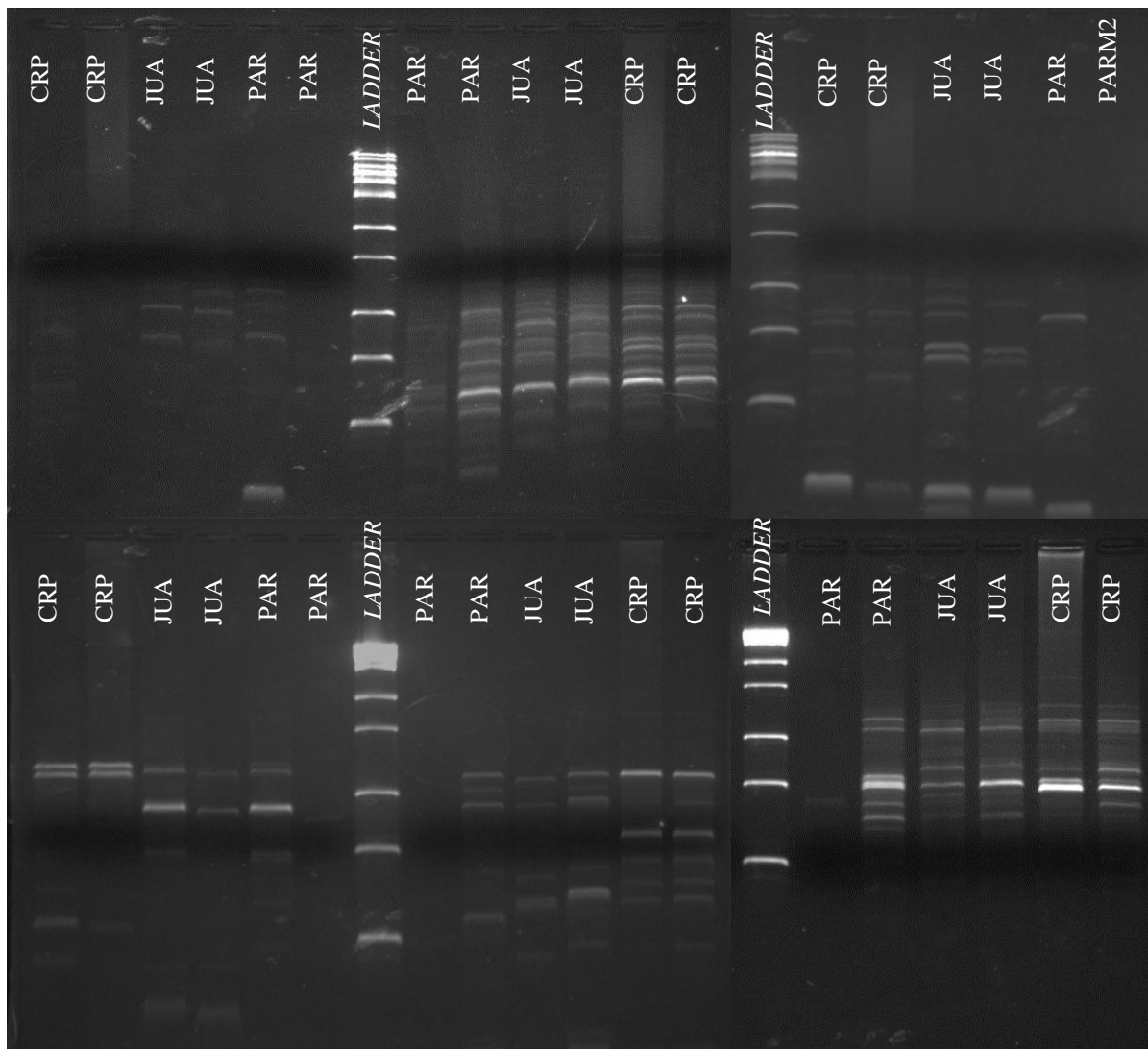
e Haowen (2004) e Vidal et al. (2006): (1) etapa primária - observação dos géis quanto a presença e ausência de bandas (matriz binária); (2) etapa de análise numérica: nesta etapa além de observar o número de bandas, a intensidade dessas bandas também é critério para agrupamento. Nesta etapa utilizamos o programa gratuito GelJ 2.0 (Heras et al. 2015), para estimar a distância genética através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*), utilizando coeficiente de similaridade de *Jaccard* (Jaccard 1908).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DAS MISTURAS DE DNA

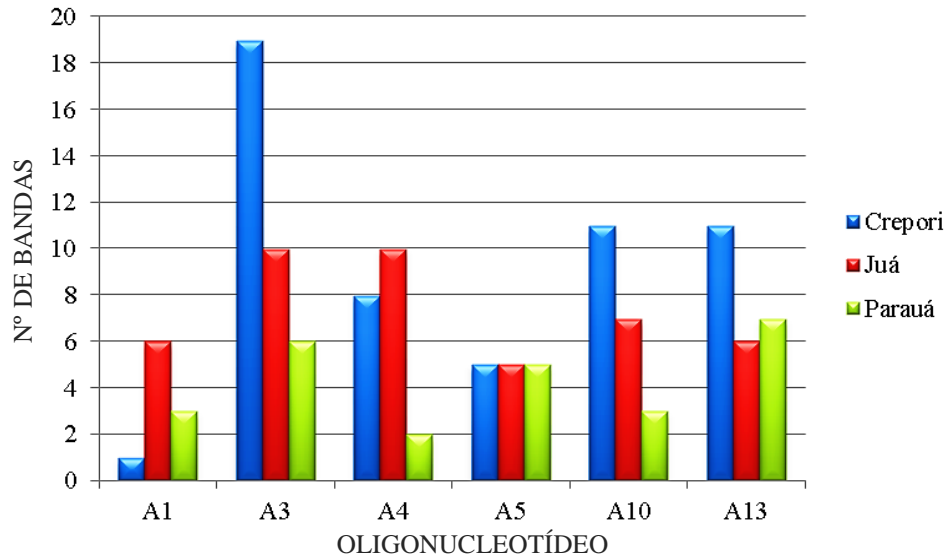
De acordo com a padronização do RAPD, somente seis oligonucleotídeos foram considerados na análise numérica, pois possuem maior número de bandas e amplificação reproduzível. Assim, para estes seis oligonucleotídeos observamos um total de 129 bandas nítidas que variaram entre pouco menos de 500 a 2000 pares de base (pb), os géis obtidos após amplificação com os seis oligonucleotídeos estão na figura 1.

Figura 1: Fotografia dos géis obtidos nos testes com as misturas de DNA de *H.malabaricus*. Da direita para esquerda, de cima pra baixo: A1, A3, A4, A5, A10 e A13. Ladder de 1kb (10.0, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5)



Os seis oligonucleotídeos analisados amplificaram, em média, sete bandas, com o A3 fornecendo o maior número de bandas amplificadas (11), e o A1 o menor deles (3) (figura 2).

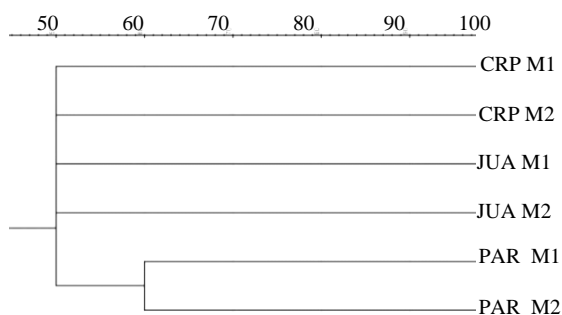
Figura 2: Número de bandas amplificadas por cada um dos oligonucleotídeos de cada área investigada.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

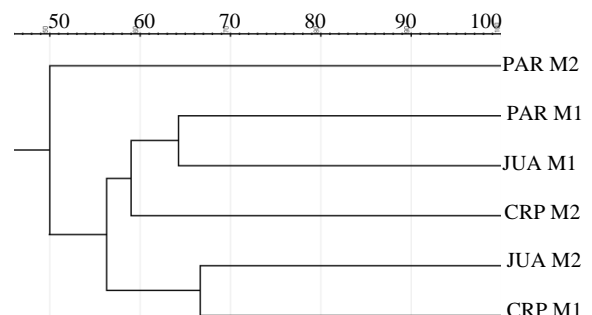
As análises de similaridade e agrupamento UPGMA, com corte de 50%, demonstraram ausência de diferenças significativas entre o número de bandas geradas pelo oligonucleotídeo A1 entre as três áreas de estudo. Por outro lado, o oligonucleotídeo A3 teve diferença entre a população Parauá com as demais (figura 5), A4 gerou diferença dentro da população de Parauá, onde a mistura 2 se diferenciou da mistura 1 e das demais populações (figura 6), A5 gerou diferença entre Crepori e demais populações, assim como a mistura 2 de Parauá (figura 7), A10 agrupou Juá tanto com Crepori como com Parauá (figura 8) e no A13 Juá foi considerado diferente das demais áreas, assim como a mistura 2 de Parauá (figura 9).

Figura 5: Dendrograma derivado com base na matriz de similaridade de Jaccard, corte de 50%, relacionando amostras as misturas de DNA após reação com o oligonucleotídeo A3.



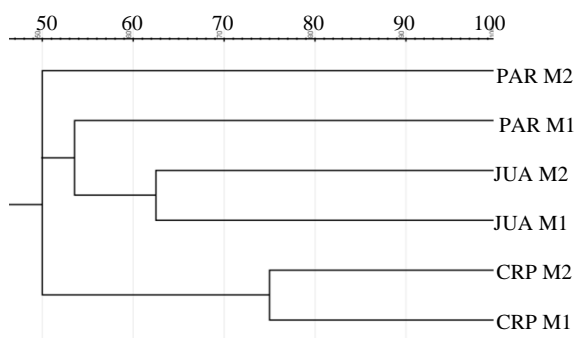
Fonte: Elaborado pelos autores no GelJ2.0, 2019

Figura 6: Dendrograma derivado com base na matriz de similaridade de Jaccard, corte de 50%, relacionando amostras as misturas de DNA após reação com o oligonucleotídeo A4.



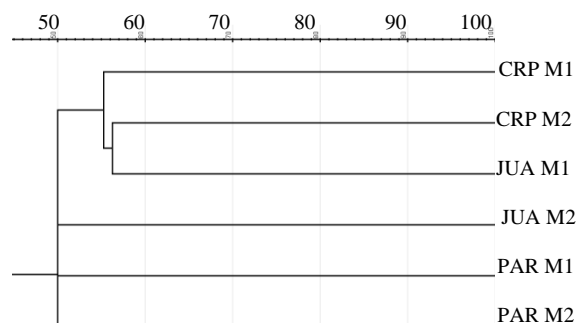
Fonte: Elaborado pelos autores no GelJ2.0, 2019

Figura 7: Dendrograma derivado com base na matriz de similaridade de Jaccard, corte de 50%, relacionando amostras as misturas de DNA após reação com o oligonucleotídeo A5.



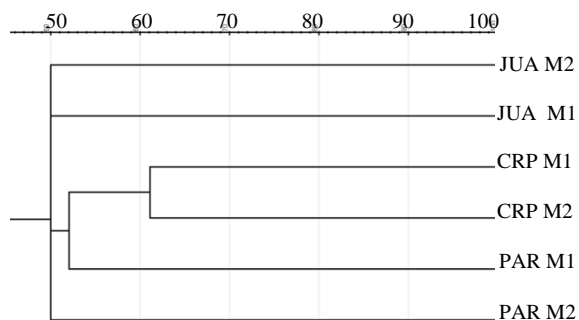
Fonte: Elaborado pelos autores no GelJ2.0, 2019

Figura 8: Dendrograma derivado com base na matriz de similaridade de Jaccard, corte de 50%, relacionando amostras as misturas de DNA após reação com o oligonucleotídeo A10.



Fonte: Elaborado pelos autores no GelJ2.0, 2019

Figura 9: Dendrograma derivado com base na matriz de similaridade de Jaccard, corte de 50%, relacionar amostras as misturas de DNA após reação com o oligonucleotídeo A13.



Fonte: Elaborado pelos autores no GelJ2.0, 2019

Quanto ao número de bandas houve um padrão médio ao analisarmos as três populações (tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos com seus respectivos números de bandas e grupos por área de estudo.

Oligonucleotídeo	Bandas CRP	Bandas JUA	Bandas PAR	Nº de grupos
A1	1	6	3	1
A3	19	10	6	2
A4	8	10	2	2
A5	5	5	5	3
A10	11	7	3	2
A13	11	6	7	3
Média	9,2	7,3	4,3	-

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Para alguns desses oligonucleotídeos não houve amplificação em todas as misturas, como duas amostras em A1 (PAR M1 e CRP M2), uma em A4 (PAR M2) e PAR M2 em A5, A10 e A13, ilustrado na figura 1.

3.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS

Considerando a tabela 1, analisamos que há diferença no padrão de bandas entre amostras de maior e menor concentração de Hg para todos os seis oligonucleotídeos testados nas misturas de DNA, mas tanto para Crepori como para Juá não foi possível visualizar um padrão de diferenciação genética em função da concentração de Hg em nenhum oligonucleotídeo.

Tabela 3: Amostras do rio Crepori utilizadas na análise individual com suas respectivas concentrações de HgT, oligonucleotídeos e respectivos números de bandas.

Oligonucleotídeo	HgT (mg.Kg ⁻¹)						Nº de grupos
	0,39	0,43	0,51	2,02	2,12	2,19	
	Nº de bandas						
A1	8	0	9	6	8	1	1
A3	14	10	15	10	14	10	2
A4	9	3	8	8	8	8	3
A5	6	2	5	5	5	2	3
A10	8	2	8	8	7	7	2
A13	13	7	11	8	10	1	2

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Tabela 4: Amostras do lago do Juá utilizadas na análise individual com suas respectivas concentrações de HgT, oligonucleotídeos e respectivos números de bandas.

Oligonucleotídeo	HgT (mg.Kg ⁻¹)						Nº de grupos
	0,23	0,34	0,36	0,51	0,61	0,64	
	Nº de bandas						
A1	3	8	7	2	2	4	2
A3	5	10	5	12	10	4	2
A4	6	5	7	8	4	6	2
A5	4	6	7	4	4	9	2
A10	6	8	4	8	5	6	2
A13	5	8	8	8	3	7	2

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

4 DISCUSSÃO

São vários os processos que podem levar à diferenciação genética dentro de uma espécie, desde eventos históricos, que podem resultar em isolamento geográfico (Dergam et al. 1998), ou relação direta com as características específicas do tributário associadas à condição ecológica em que esta população é submetida (Carlsson et al. 1999), às condições estressantes do ambiente (Market et al. 2010), incluindo a exposição da espécie a diferentes poluentes, sejam eles químicos, físicos ou biológicos, uma vez que a contaminação ambiental exerce elevada pressão sobre a população de espécies de peixes e causam diversos danos ao DNA desses organismos (Rodrigues et al. 2017). O conhecimento dos padrões de bandas nas populações de *H. malabaricus*, é essencial para o monitoramento da Amazônia, afinal, se trata de uma promissora espécie bioindicadora, por suas características já mencionadas.

As variações nos padrões de bandas RAPD observadas nas três populações de *H. malabaricus* da bacia do rio Tapajós pode ser resultado de inúmeros fatores, porém, a caracterização das áreas do baixo Amazonas em que as amostras foram coletadas, descritas no trabalho de Alves (2017) e de Silva (2017), onde destacam o histórico de garimpo ao redor do rio Crepori, o aumento da ação antrópica próximo ao lago do Juá e o passado da Comunidade Parauá, antes de se tornar uma ResEx, nos permitem inferir que o Hg pode sim ser um desses fatores, uma vez todas essas atividades citadas contribuem para o aumento da exposição desse metal que é um dos metais com maior toxicidade e potencial causador de efeitos genotóxicos (WHO, 1990).

Ao analisarmos as misturas de DNA, em quase 100% dos agrupamentos, a população de Parauá esteve distante geneticamente de Crepori (com maior distância) e Juá, e Crepori que possui amostras com concentrações de Hg muito acima da concentração limite de Hg em peixes para consumo humano recomendado pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é 1.0 mg.kg^{-1} (carnívoros) e $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ (não carnívoros) respectivamente, corrobora com a hipótese de que a exposição ao Hg já esteja causando danos, mesmo que tímidos, ao DNA, e que o efeito genotóxico pode ser observado pela inserção de bandas, e essa alteração no número de bandas está associada a alterações do material genético (Rocco et al. 2015). Por outro lado, mesmo que as análises individuais não tenham apresentado um padrão quanto ao número e intensidade de bandas, talvez pelo N amostral baixo, não descartamos que esse resultado possa ser considerado em futuros estudos, pois apesar de ser a primeira vez em que se utiliza RAPD para investigar a variabilidade genética em *H. malabaricus* de ambientes naturais do baixo Amazonas, a fim de investigar possíveis danos ao DNA causado por Hg, conseguimos ultrapassar o maior gargalo da técnica que é a reprodutibilidade, e é claro que ainda são necessárias adaptações à metodologia e

principalmente quantificar outros poluentes presentes, além de análise de qualidade de água e/ou realizar novas coletas, afinal, danos ao DNA podem ser a longo prazo e as amostras utilizadas foram coletadas em 2015.

Utilizando as mesmas amostras, Alves (2017) observou através de Teste de Micronúcleo (NM) e Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE), baixa frequência de NM e de ANE, mas sem diferença significativa entre as populações. Porém Silva (2017), com amostras do rio Crepori e do lago do Juá, usando as técnicas acima, também encontrou baixa frequência de NM e ANE, sem diferenças significativas entre as populações, mas, ao analisar danos de Ensaio Cometa em eritrócitos (EC) medidos por escores, onde o valor pode variar de 0 a 400, onde 0 equivale a ausência de dano e 400 o maior grau de dano, observou nas amostras do lago do Juá o escore de 68.1, enquanto que, as do rio Crepori apresentaram escore de 156.9, as comparações entre os valores médios para as duas populações mostraram diferença estatística ($p=0.0001$). Para os autores, mesmo sem diferenças significativas na maioria das análises, não descartam que é necessário maiores investigações.

Por outro lado, Guimarães (2018), utilizando genes da Citocromo Oxidase I (COI), observou uma clara distinção da população do rio Crepori com as demais populações (Parauá e Juá), além de observar que a população do lago do Juá possui maior diversidade genética, mas que talvez seja resultado da localização deste lago que é anualmente submetido às oscilações do pulso de inundações dos rios Tapajós e Amazonas, fator mencionado por Marques et al. (2013), quando obteve diferentes haplogrupos desta espécie em estudo com amostras do baixo rio Amazonas, reforçando mais uma vez que fatores ambientais atuam diretamente no DNA dos peixes.

Outros estudos também buscam correlacionar a concentração de Hg em peixes com: peso e comprimento (Perez 2008; Silva 2017); comprimento e idade (França 2017), alterações hematológicas de células e componentes do sangue, efeito neurotóxico e os efeitos do MeHg no rim e fígado (Mela 2004), efeitos do MeHg na retina (Mela 2009). Mas, poucos estudos mencionam o uso do RAPD como ferramenta para investigar os efeitos de metais pesados em animais, a maioria dos trabalhos que o utiliza é para analisar diversidade genética, principalmente de vegetais (Halmers 1992; Binneck, Nedel, Dellagostin 2002; Bhadragoudar e Patil 2011).

Banci (2008), por meio do RAPD, investigou os efeitos da poluição por metais pesados sobre o *Ucides cordatus* (caranguejo-uçá) em três localidades de manguezal da Região Metropolitana da Baixada Santista (Juréia, Cubatão e São Vicente) e encontrou diferenças significativas entre as populações. Assim como Lerebours et al. (2013) que ao inserirem 13,5 $\mu\text{g/g}$ de Hg na dieta de peixes-zebra (*Danio rerio*), concentração de Hg encontrada em várias

presas da cadeia alimentar da Guiana Francesa, também encontraram diferenças ao analisarem os produtos do RAPD e o comparar com o controle. A mesma espécie de peixe foi utilizada por Zhiyi e Haowen (2004), que ao exporem *D. rerio* a diferentes concentrações nominal de fosfamida (0,05, 0,1, 1,0 e 10,0 mg/ L) e dimetoato (1,0, 10,0 e 100,0 mg/ L) durante noventa e seis horas, sem inserir nenhum alimento aos peixes nesse período, concluíram que o efeito genotóxico desses produtos químicos é promovido pela concentração, ou seja, o aumento da concentração do produto químico genotóxico causa perda no número de bandas estáveis.

Bem Salem et al. (2014) ao analisar pela primeira vez os impactos de poluentes em peixes (*Rutilus rutilus*) expostos a lixiviados de aterros sanitários, utilizando RAPD-PCR, também observaram mudanças aparentes no padrão de bandas, como aparecimento ou desaparecimento de bandas, quando comparavam com peixes coletados em uma lagoa de referência não poluída e, apontam a alta capacidade do RAPD em detectar alterações genéticas significativas no DNA de peixe, após a contaminação com um conjunto de metais contidos nos lixiviados. Um ano depois, Rocco et al. (2015), utilizando a mesma técnica, investigaram o potencial efeito genotóxico causado em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) expostos por quatro dias, *in vivo*, a dióxido de titânio nanosizado (n-TiO₂) (100 µg L⁻¹) sozinho e em combinação com CdCl₂ (100 µg L⁻¹) e compararam os resultados com um grupo não tratado com nenhum desses compostos. O resultado mostrou que a exposição a n-TiO₂ resulta em perda de bandas e ao expor a CdCl₂, o número de bandas se manteve igual ao do grupo não tratado, então expuseram um quarto grupo à co-exposição a n-TiO₂ e CdCl₂ e resultou apenas no desaparecimento de bandas em relação ao grupo não tratado.

Portanto, o RAPD é um método simples, barato e vem se mostrando uma poderosa ferramenta não apenas para a discriminação de espécies, mas também em genética de populações, como por exemplo na ecotoxicologia, usando como julgamentos de genotoxicidade a comparação de populações controle e populações expostas, e como uma perspectiva futura com *H. malabaricus* do baixo Amazonas, destacamos que a metodologia utilizada por Zhiyi e Haowen (2004) pode ser uma forte modelagem a ser adaptada e empregada nesta espécie.

5 CONCLUSÃO

- O RAPD é um método útil e prático para a detecção de genotoxicidade em *H. malabaricus* da bacia do rio Tapajós;
- A população de *H. malabaricus* proveniente do rio Crepori possui maior número de bandas e é a população com maiores concentrações de HgT, o que pode justificar esse resultado;

- Não foi possível observar um padrão de bandas ao analisar amostras individuais com maior e menor concentração de HgT;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves DM (2017) Bioacumulação de mercúrio e genotoxicidade em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes Erythrinidae) da bacia do rio Tapajós. Monografia, Universidade Federal do Oeste do Pará

Arrifano GPF (2016) Análise de parâmetros de exposição mercurial, suscetibilidade genética e intoxicação em populações ribeirinhas do Tapajós e Tucuruí. 2016. 91 f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Pará

Atienzar, FA, Billingham Z, Depledge MH (2002) 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. Environ Pollut. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00184-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00184-7)

Banci KRS (2008) A influência de metais pesados na diversidade genética de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae), em manguezais do litoral paulista. Tese, Universidade de São Paulo

Bem Salem Z, Capelli N, Grisey E et al (2014) First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. Ecotoxicol Environ Saf. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.014>

Bhadragoudar MR, Patil CG (2011) Assessment of genetic diversity among *Capsicum annuum* L. genotypes using RAPD markers. African Journal of Biotechnology. <https://doi.org/10.5897/AJB11.497>

Binneck E, Nedel JL, Dellagostin OA (2002) Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? Rev. bras. sementes. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222002000100027>

Brabo ES (2010) Geoquímica do Mercúrio na Bacia do Tapajós: do natural ao antropogênico. Instituto Evandro Chagas, Ananindeua

Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY et al. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. [https://www.researchgate.net/publication/240129725_Single-](https://www.researchgate.net/publication/240129725_Single-Locus_and_Multilocus_DNA_Fingerprinting/citation/download)

[Locus_and_Multilocus_DNA_Fingerprinting/citation/download](https://www.researchgate.net/publication/240129725_Single-Locus_and_Multilocus_DNA_Fingerprinting/citation/download). Acessado em 29 de Setembro de 2019

Carlsson J, Olsén KH, Nilsson J et al. (1999) Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. Journal of Fish Biology <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb02076.x>

Cestari MM, Lemos PMM, Oliveira Ribeiro CA et al. (2004) Genetic damage induced by

- trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. Genet. Mol. Biol. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000200023>
- Dagostim AC (2014) Avaliação da genotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio (tio₂) e chumbo inorgânico (pbii) em *Hoplias intermedius* (erythrinidae) após exposição hídrica. Monografia de graduação, Universidade Federal do Paraná
- De Wolf H, Blust R, Backeljau T (2004) The use of RAPD in ecotoxicology. Mutat Res. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.10.003>
- Dergam JA, Paiva SR, Schaeffer CE (2002) Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. Genet. Mol. Biol. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572002000400005>
- Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovan MS et al. (2004) Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. Genet. Mol. Biol. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>
- França AJ (2017) Dinâmica espaço temporal e influência do metilmercúrio em peixes do Lago Janauacá, AM. Dissertação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA
- Freitas CEC, Siqueira-Souza FK (2009) O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. Revista Agrogeoambiental. <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v1n2200975>
- Guimarães, KLA (2018) Diversidade molecular em populações de *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae – Characiformes) de áreas atingidas por atividades antrópicas relacionadas ao garimpo na bacia do rio Tapajós. Relatório de Iniciação Científica.
- Halmers K, Waugh R, Sprent J et al. (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. Heredity. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.151>
- Hensley DA, Moody DP (1975) Occurrence and possible establishment of *Hoplias malabaricus* (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. Florida Scientist. <https://www.jstor.org/stable/i24313782>. Acessado em 29 de Setembro de 2019
- Heras J, Domínguez C, Mata, E et al (2015) GelJ - uma ferramenta para analisar imagens de gel de impressão digital de DNA. BMC Bioinformatics. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Jesus TB, Carvalho CEV (2008) Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). Oecologia Brasiliensis. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1204.07>

- Lacerda LD, Santos AF, Marins RV (2007) Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. *Quím. Nova.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200024>
- Lerebours A, Cambier S, Hislop L et al (2013) Genotoxic effects of exposure to waterborne uranium, dietary methylmercury and hyperoxia in zebrafish assessed by the quantitative RAPD-PCR method. *Mutat Res.* <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.05.012>
- Lopes-Poleza SCG (2004) Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH₃Hg⁺) em *Hoplias malabaricus*, através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios cometa e micronúcleo. Dissertação, Universidade Federal do Paraná
- Marins RV, Filho FP, Maia SRR et al. (2004) Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. *Química Nova.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500016>
- Markert JA, Champlin DM, Gutjahr-Gobell R et al. (2010) Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC Evolutionary Biology.* <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-205>
- Marques DF, Santos FA, Silva SS et al. (2013) Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology.* <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252013000200015>
- Mela M (2004) Uso de Biomarcadores na Avaliação dos Efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). Dissertação, Universidade Federal do Paraná
- Mela M (2009) Avaliação dos efeitos tóxicos do metilmercúrio na retina de duas espécies de teleósteos: *Hoplias malabaricus* e *Danio rerio*, utilizando um conjunto de biomarcadores biológicos. Dissertação, Universidade de São Paulo
- Mela M, Neto FF, Yamamoto FY et al. (2014) Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Fish Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9840-4>
- Mitchelmore CL, Chipman JK (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res.* [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00252-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00252-2)
- Oliveira Ribeiro CA, Yannick D, Boudou A et al. (2008) Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.10.033>
- Perez TD (2008) Avaliação da contaminação de *Hoplias malabaricus* (Traíra) como bioindicadora de saúde ambiental em pisciculturas em áreas de garimpo. Estudo de caso município de Paranaíta – MT. Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

- Rabello-gay MN, Rodrigues MAR, Monteleone-Neto R (1991) Mutagenese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto
- Ramsdorf WA, Ferraro MV, Oliveira-Ribeiro CA et al. (2009) Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. Environ. Environ <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-008-0566-1>
- Rocco L, Santonastaso M, Nigro M et al (2015) Genomic and chromosomal damage in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects of the combined exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium chloride. Mar Environ Res. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.004>
- Rodrigues APC, Maciel P, Silva LCP et al (2017) Chronic Effects of Methylmercury on *Astronotus ocellatus*, an Amazonian Fish Species. J Aquat Pollut Toxicol 1:2. <https://www.cetem.gov.br/images/periodicos/2017/CAN0007-00-17.pdf>.
- Silva CA, Oba ET, Ramsdorf WA et al. (2011) Firsh report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. Toxicon. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.015>
- Silva CDL (2017) Análise de genotoxicidade e níveis de mercúrio em *Hoplias malabaricus* (pisces-characiformes) de duas áreas da bacia do rio tapajós. Dissertação, Universidade Federal do Oeste do Pará
- Siqueira GW, Aprile FM (2012) Distribuição de mercúrio total em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica: Brasil. Acta Amaz. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672012000200012>.
- Val AL, Almeida-Val VMF, Fearnside PM et al. (2010) Amazônia: Recursos hídricos e sustentabilidade. Academia Brasileira de Ciências & Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. https://www.researchgate.net/publication/278964916_Amazonia_recursos_hidricos_e_sustentabilidade Acessado em 20 de Setembro de 2019
- Vidal RA, Hernandez GC, Winkler LM et al. (2006) Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. Planta Daninha. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000100019>.
- WHO (1990) Methylmercury. World Health Organization. <https://doi.org/10.1002/food.19910350318>.
- Zhiyi R, Haowen Y (2004) A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. Ecotoxicology and Environmental Safety. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.09.016>