



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

HEVELINE CAMPOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E HISTOLÓGICA EM PEIXES
(*Hyphessobrycon heterorhabdus*) DO IGARAPÉ
CARARAZINHO EXPOSTOS AO CHORUME DA LIXEIRA
PÚBLICA DE SANTARÉM – PA**

**SANTARÉM – PA
2019**

HEVELINE CAMPOS PEREIRA

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E HISTOLÓGICA EM PEIXES

(*Hyphessobrycon heterorhabdus*) DO IGARAPÉ

CARARAZINHO EXPOSTOS AO CHORUME DA LIXEIRA

PÚBLICA DE SANTARÉM – PA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências – PPGBio da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Área de Concentração: Fisiologia Ambiental
Orientador: Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

SANTARÉM – PA
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

P436a Pereira, Heveline Campos
 Avaliação genotóxica e histológica em peixes (*Hyphessobrycon heterorhabdus*) do Igarapé Cararazinho expostos ao chorume da lixeira pública de Santarém / Heveline Campos Pereira. - Santarém, 2019.
 73 f. : il., color.

 Orientador: Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará,
 Programa de Pós-graduação em Biociências.

 1. Histopatologia. 2. Micronúcleo. 3. Anormalidades nucleares. 4. Ensaio cometa. I. Rodrigues, Luís Reginaldo Ribeiro, *orient.* II. Título.

CDD: 23. ed. 571.95

Bibliotecário-Documentalista: Cátia H. Favacho Alvarez Rodrigues – CRB/2 – 823

HEVELINE CAMPOS PEREIRA

AVALIAÇÃO DE GENOTÓXICA E HISTOLÓGICA EM PEIXES

(Hyphessobrycon heterorhabdus) DO IGARAPÉ

CARARAZINHO EXPOSTOS AO CHORUME DA LIXEIRA

PÚBLICA DE SANTARÉM – PA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências – PPGBio da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Área de concentração: Fisiologia Ambiental.
Linha de pesquisa: Mutagênese Ambiental.

Conceito: *Aprovada*
Data de Aprovação 25 / 03 / 19

Luís Reginaldo R. Rodrigues

Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues – Orientador
Universidade Federal do Oeste do Pará

Marcos Prado Lima

Prof. Dr. Marcos Prado Lima
Universidade Federal do Oeste do Pará

Maxwell Barbosa de Santana

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Universidade Federal do Oeste do Pará

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus por ser minha luz nestes dois anos de mestrado. Segundo, à minha família por ser meu combustível diário para não desistir nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter sido minha força nos momentos mais difíceis dessa jornada. Agradeço ao Prof. Dr. Luís Reginaldo, pela oportunidade de entrar no seu grupo de pesquisa, por toda a atenção, zelo e amizade que pôde me oferecer durante a pesquisa, suas contribuições foram de grande valia tanto para o trabalho quanto para a vida, sempre me lembrarei de seus conselhos. Meu sincero obrigada aos meus pais por toda base familiar para me manter no mestrado e concluí-lo com êxito, sem vocês eu não conseguiria, obrigada por tudo.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Genética e Biodiversidade, Karen, Thaís, Luan, Mendelsohn, Alcimara, Aline e Albino pelas contribuições e principalmente da ajuda nas coletas na lixeira pública e no igarapé Carazinho. Às minhas amigas de vida Alcimara e Yasmin por todas as vezes me cederam seus ombros para compartilharmos momentos difíceis, e por viverem também momentos maravilhosos, o meu muito obrigada. Agradeço a Msc. Ellen Monique, colega de profissão, que ajudou arduamente nas técnicas de histologia no Laboratório de Química Multidisciplinar. Agradeço ao Prof. João Palheta enquanto responsável pela visitação a Lixeira pública de Santarém – PA que sempre se mostrou muito solícito para dar permissão as coletas realizadas no local.

Ao CNPq na pessoa do Dr. Adalberto Val coordenador do Projeto INCT Adapta II, pelo apoio financeiro a este projeto de mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

E por fim agradeço à Universidade Federal do Oeste do Pará e o Programa de Pós-Graduação em Biociências, pela oportunidade de estudo.

EPÍGRAFE

“ Produz uma imensa tristeza pensar que a natureza fala enquanto a humanidade não escuta ”

Victor Hugo

RESUMO

A enorme geração de lixo é uma das principais questões ambientais da atualidade. O descarte e tratamento inadequado do lixo oferecem sérios riscos para a saúde humana e dos ecossistemas. O chorume, líquido produzido pela decomposição do lixo, pode conter muitas moléculas potencialmente danosas para o material genético, tais como metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHA). O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico e histopatológico do chorume proveniente da Lixeira Pública de Santarém em peixes - *Hyphessobrycon heterorhabdus*. Foram realizadas as técnicas do micronúcleo, anormalidades nucleares eritrocitárias e ensaio cometa para a avaliação da genotoxicidade. Danos teciduais foram avaliados em preparações histológicas de brânquias e fígado. No laboratório, os peixes foram expostos ao chorume (10, 5 e 2%), água natural do igarapé Cararazinho, e benzeno 20ppm. Os biomarcadores de genotoxicidade não tiveram variação significativa entre os grupos expostos e água do igarapé, porém estes tratamentos evidenciaram danos genotóxicos. Os tecidos branquiais e hepáticos mostraram variados tipos de alterações morfológicas. Portanto, na luz dos dados obtidos conclui-se que a água do igarapé Cararazinho, ao receber descarga de chorume da lixeira pública de Santarém, contribui para a ocorrência de danos genotóxicos e teciduais em peixes das espécies *H. heterorhabdus*.

Palavras-chaves: Micronúcleo; Anormalidades Nucleares; Ensaio Cometa; Histopatologia;

ABSTRACT

The enormous garbage production is one of the major environmental issues in the present. The inappropriate discard and management of garbage give serious risks to the human and ecosystem health. The leachate, liquid produced by garbage decomposition, may contains harmful molecules that damage the genetic material, such as heavy metals and aromatic polycyclic hydrocarbon (APH). The present study goals to evaluate the genotoxic and histopathological effects of the leachate from Santarém Landfill Dump in fishes - *Hyphessobrycon heterorhabdus*. Micronucleus, erythrocyte nuclear abnormalities techniques and comet assay were conducted for the genotoxicity evaluation, while tissue injuries were assessed with gills and liver histological preparations. The fishes were exposed to leachate (10, 5 and 2%), to natural stream Cararazinho's water and to 20ppm benzene. The genotoxicity biomarkers do not evidenced significant variation between exposed and control group (stream natural water). Gills and liver showed diverse types of tissue lesions. Therefore, under the light of these results we conclude that Cararazinho's stream water, because receives leachate from the Santarém Landfill Dump, plays to the occurrence of genotoxic and tissue damages in fishes *H. heterorhabdus*.

Key-Words: Micronucleus; Erythrocyte Nuclear Abnormalities; comet assay, Histopathology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Vista aérea da Lixeira pública de Santarém – PA (delimitada por linha laranja), e das duas piscinas de decantação do chorume (delimitada por linha amarela), e rodovia Santarém-Curua-una (indicada por seta). Fonte: Google Earth. 19
- Figura 2:** Formação do micronúcleo, por meio de evento aneugênico e clastogênico. Fonte: Terradas et al., (2010). 23
- Figura 4:** Ranking das classes de danos ao DNA detectados por ensaio cometa. Fonte: adaptado de Valente et. al., (2017). 25
- Figura 5:** Aspectos da morfologia externa de *Hyphessobrycon heterorhabdus*, Ordem Characiformes. Fonte: Acervo LGBio-UFOPA. 29
- Figura 6:** Localização da lixeira pública de Santarém delimitada pela linha amarela. Leito do Igarapé Cararazinho (linha azul). Estrada de acesso a comunidade Miritituba (linha branca). Em destaque: Mapa do Brasil, Estado do Pará, com a área de estudo no retângulo branco. Fonte: Google Earth. 31
- Figura 7:** Localização e características dos locais de coleta de chorume da Lixeira Pública de Santarém (LPS) e de amostras (águas, peixes) do Igarapé Cararazinho, na área de influência da LPS. a) Pontos de coleta de amostras (setas) e curso estimado do igarapé (linha amarela); b) aspecto físico do igarapé Cararazinho no dia da coleta; c) coleta e coloração do chorume da LPS; d) coleta de peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus* no igarapé Cararazinho; e) acondicionamento de peixes para transporte ao laboratório; f) coleta de água do igarapé. 41
- Figura 8:** Espécimes de *Hyphessobrycon heterorhabdus* com mortalidade de 100% após menos de uma hora de exposição a solução de chorume 20% coletada da Lixeira Pública de Santarém. 44

Figura 9. Eritrócitos de *Hyphessobrycon heterorhabdus* em distensão sanguínea corada por Giemsa. A) uma célula com micronúcleo (seta); B) célula sem alteração....46

Figura 10. Eritrócitos de *Hyphessobrycon heterorhabdus* em distensão sanguínea corada por Giemsa. A) “Lobed”; B) “Blebbled”; C) Binucleate, D) “Notched”, E) Vacuolated (indicado por seta) e F) Célula normal. Visualização microscópica de 1000x.47

Figura 11: Classe de danos de DNA (teste do cometa) observados em eritrócitos de peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*, expostos a diferentes concentrações de chumbo da Lixeira Pública de Santarém. Classe 0 (sem danos) (0), classe 1 (1), classe 2 (2); classe 3 (3) e classe 4 (dano máximo) (4)49

Figura 12. Cortes de filamentos branquiais dos peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*. A) Brânquias normais. B): brânquias com alterações: Hiperplasia do epitélio lamelar (setas); C) Hiperplasia do epitélio filamentar (setas); D) Fusão incompleta das lamelas secundárias (seta); E) Fusão completa das lamelas secundárias; F) Aneurisma Lamelar. Aumento: 400X. Escala 20 µm. Coloração HE.....52

Figura 13. Cortes do tecido hepático dos peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*. A) necrose indicado pela seta B) Vacuolização dos hepatócitos (setas); C) Congestão Vascular (setas); D) Deformações nucleares (setas); E) Degeneração citoplasmática (setas); F) parasito (seta). Aumento: 400X. Escala 20 µm. Coloração HE.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores dos índices das alterações com os efeitos nos órgãos. Fonte: Nogueira <i>et al.</i> , (2011).....	38
Tabela 2: Valores médios e desvio padrão de medidas de parâmetros físicos nas soluções testes e controles utilizados para exposição e análise genotóxica de peixe <i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> do Igarapé Cararazinho, na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA.....	42
Tabela 3: Análise descritiva de peso e comprimento de <i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> do igarapé Cararazinho. N= número de peixes analisados, CMP= comprimento.....	44
Tabela 4: Frequência de micronúcleos em <i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> do igarapé Cararazinho, expostos ao chorume da lixeira pública de Santarém-PA. N= número de peixes por tratamento; MN= Micronúcleo; DP=Desvio padrão.....	45
Tabela 5: Frequência média e desvio padrão de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE) em <i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> do igarapé Cararazinho, expostos ao chorume a lixeira pública de Santarém-PA. Foram analisadas 2000 células por indivíduo.....	46
Tabela 6: Média e desvio padrão dos escores de Índice de Danos no DNA revelados por ensaio cometa em peixes <i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> do Igarapé Cararazinho na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA.	49
Tabela 7: Frequência de alterações histológicas com respectivos estágios I, II e III encontradas nas brânquias de <i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> do igarapé Cararazinho, na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA.	51
Tabela 8: Frequências de alterações histopatológicas no fígado de <i>Hyphessorycon heterorhabdus</i> do igarapé Cararazinho na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA T1: água natural do igarapé, T2: benzeno 20 ppm, T3: chorume 10%, T4:	

chorume 5% e T5: chorume 2%. 0 ausente; + presente; ++ frequente; +++ muito frequente.....55

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
SEMA/STM	Secretaria do Meio Ambiente de Santarém
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
MN	Micronúcleo
ANE	Anormalidades nucleares eritrocitárias
EC	Ensaio cometa
ANA	Agência Nacional das guas
LGBio	Laboratório de Genética e Biodiversidade
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
IAH	ndice de alteração histológica
LPS	Lixeira pública de Santarém
ICTA	Instituto de Ciência e Tecnologia das guas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
LPP	Lixeira pública de Parintins

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. A LIXEIRA PÚBLICA DE SANTARÉM-PA.....	19
2.2. CARACTERIZAÇÃO DO CHORUME	21
2.3. TESTES DE GENOTOXICIDADE E ANORMALIDADES NUCLEARES USADOS COMO BIOMARCADORES	22
2.4. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS	26
2.5. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO.....	27
2.6. OS PEIXES DO GÊNERO <i>Hyphessobrycon</i>.....	28
3- OBJETIVOS.....	30
3.1. OBJETIVO GERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 COLETA DO CHORUME	31
4.2 COLETA DOS PEIXES E ACLIMATAÇÃO	32
4.3. EXPOSIÇÃO AO CHORUME.....	32
4.4. ACOMPANHAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICOS DOS AQUÁRIOS EXPERIMENTAIS.	33
4.5 PARÂMETROS GENOTÓXICOS E HISTOLÓGICOS.....	34
4.5.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ANORMALIDADES NUCLEARES .34	
4.5.2. ENSAIO COMETA	35
4.5.3. PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA DE BRÂNQUIAS E FÍGADO.....	37
4.6. ANÁLISE DE DADOS	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1. COLETAS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES TESTES	.40
5.2. SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS	43
5.3. MICRONÚCLEOS E ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS	45
5.4. ENSAIO COMETA	49
5.5. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS E FÍGADO	51
8. CONCLUSÕES	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1.INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento populacional humano, ao progresso industrial e ao avanço da tecnologia, presenciamos o aumento preocupante da geração de resíduos sólidos que contribui para a alteração e degradação de ecossistemas (SILVA, 2008). Praticamente em todo o planeta o meio ambiente sofre interferência direta ou indireta do homem, como por exemplo, por meio de desflorestamentos, contaminação dos ambientes aquáticos e contaminação de lençol freático, resultando na redução da diversidade de habitats e perda da biodiversidade (GOULART; CASTILLO, 2003).

Atualmente, uma das grandes preocupações ambientais está relacionada aos resíduos sólidos gerados em quantidades significativas pela sociedade moderna e consumista (LEITE; BERNARDES; SEBASTIÃO, 2004). Segundo a definição sobre resíduos sólidos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) eles são advindos das atividades domésticas, industriais, hospitalares, comerciais, agrícolas e de serviços de varrição. Estes resíduos são considerados perigosos para a saúde humana e ecossistemas, pois podem conter numerosas espécies químicas, cujas concentrações dependem da composição do lixo, uma vez que este é uma combinação de objetos e materiais de várias naturezas (DOS SANTOS, 2012).

As áreas de despejo e de disposição dos resíduos sólidos no Brasil são realizadas, em sua maioria, em lixões, aterros controlados e aterros sanitários, os quais frequentemente não são aparelhados para conter adequadamente muitos elementos derivados dos rejeitos, pois, quando a água das chuvas, por exemplo, percorre sobre eles gera um líquido escuro, mais conhecido como chorume, que contém altas concentrações de metais pesados, sólidos suspensos e compostos orgânicos originados da degradação de substâncias que são metabolizadas, como carboidratos, proteínas e gorduras (SISSINO & MOREIRA, 1996). O chorume é um líquido fétido, de cor negra, que apresenta uma elevada concentração de oxigênio (SEGATO; SILVA, 2000). Dessa forma este líquido pode assorear e alcançar as biotas aquáticas, como também infiltrar-se no solo e atingir as águas subterrâneas, comprometendo sua qualidade e, por conseguinte, sua utilização para diversas formas de vida como para o ser humano, animais, vegetais e micro-organismos (SISSINO & MOREIRA, 1996).

O aumento da descarga do chorume tem afetado diretamente o equilíbrio dos ecossistemas, o que tem chamado atenção de pesquisadores para averiguar a toxicidade deste líquido em organismos vivos de ambientes aquáticos (DOS SANTOS, 2012; MACHADO, 2005; FINCKLER, 2002). Por ser um líquido composto por diversas substâncias químicas, estas substâncias apresentam ligações com o DNA, causando alterações ou danos no material genético, sendo chamados de agentes genotóxicos ou mutagênicos (BOER; HOEIJMAKERS, 2000). A genotoxicidade é um termo utilizado para caracterizar os efeitos de um agente sobre a molécula de DNA, como formação de adutos, lesões, síntese não programada e trocas de cromátides-irmãs, e a mutagenicidade caracteriza a indução de mutações no nível gênico ou cromossômico (CARITÁ, 2010).

A análise das alterações do DNA em organismos aquáticos tem mostrado ser um método adequado para avaliar a contaminação genotóxica de ambientes, sendo capaz de detectar o nível de exposição, mesmo em baixas concentrações de contaminantes em uma ampla gama de espécies. Neste caso, se tem diversos peixes que são usados para biomonitorização ambiental, por serem organismos endêmicos que servem de espécies sentinelas para uma determinada região aquática, para a obtenção de conhecimento sobre os efeitos adversos de produtos químicos e condições ambientais (DHAWAN et. al., 2008).

Os peixes também podem sofrer danos estruturais significativos em seus órgãos quando expostos a poluentes, o que pode levar a alterações na estrutura histológica e comprometer as funções dos órgãos, essas mudanças podem ocorrer a nível celular e tecidual acarretando em alterações metabólicas no organismo (BALULA, 2011). Estudos histopatológicos têm sido utilizados para ajudar na identificação dessas alterações em órgãos alvos da toxicidade e seus mecanismos de ação (CAMPOS, 2007). Esses estudos também revelam os efeitos em níveis histológicos que são visíveis após a exposição em substâncias tóxicas mesmo em baixas concentrações, em comparação a outras medidas de toxicidade como mortalidade e mudanças no comportamento (WESTER et al., 2002). Os estudos histopatológicos têm tido grande relevância nas pesquisas que avaliam os efeitos dos contaminantes nos peixes no meio

ambiente para estabelecer relações entre a exposição a contaminantes e as várias respostas biológicas (HENRIQUE, 2008).

A histopatologia fornece um resultado de nível superior, pois reflete alterações nas funções fisiológicas e/ou bioquímicas. Os danos em tecidos branquiais são constantemente pesquisados em peixes coletados em ambientes naturais poluídos para avaliar a degradação do ambiente aquático, ou em peixes expostos a substâncias testes em laboratório para validar substâncias tóxicas ao peixe (CANTANHÊDE et al., 2014). O tecido do fígado também pode ser considerado um órgão alvo de toxicidade de uma substância tóxica, o que caracteriza o fígado como um biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998). O fígado tem uma alta concentração de glutathione – S – transferase, sendo um órgão biotransformador, por isso é considerado um bom órgão para a toxicidade ambiental (AMORIM, 2003).

A crescente demanda de lixo e a sua disposição final inadequada em áreas impróprias se tornou um grande problema, que ocorre tanto em centros urbanos quanto em cidades do interior (DOS SANTOS, 2012). Na cidade de Santarém – PA, localizada a Oeste do Estado, o descarte do lixo é realizado sem tratamento prévio em uma lixeira pública localizada na rodovia santarém-curua-una, km 13 (Figura 1). Nesta área existem igarapés que potencialmente são receptores dos extravasamentos das piscinas de decantação do chorume e de pontos de derrames do chorume, resultando no alcance do líquido negro aos ecossistemas aquáticos e terrestres ao redor, como o lago do Maicá e seus afluentes, um agravante para a biologia dos ecossistemas naturais.



Figura 1: Vista aérea da Lixeira pública de Santarém – PA (delimitada por linha laranja), e das duas piscinas de decantação do chorume (delimitada por linha amarela), e rodovia Santarém-Curuá-una (indicada por seta). Fonte: Google Earth.

No presente estudo iremos investigar os possíveis efeitos da exposição ao chorume em peixes nativos da microbacia do Igarapé Cararazinho, situado na área de influência e atingido por extravasamento ocasional de chorume da lixeira pública de Santarém.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A LIXEIRA PÚBLICA DE SANTARÉM-PA

A lixeira pública do município de Santarém – PA, também conhecido como Lixão do Perema, localizado às margens da rodovia estadual PA-370 (Santarém Curuá-Una), possui 16 anos de operação, recebendo uma carga diária de cerca de 170

toneladas de lixo, atendendo aos núcleos urbanos de Santarém, Alter do Chão, Belterra e Mojuí dos Campos (Com. Pess. – SEMA/STM). Os rejeitos hospitalares são descartados em fossas forradas com lona que recebem areia e cal para aterrá-los, e os rejeitos das distribuidoras como vidros, papelões, plásticos e afins são apenas jogados na grande área da lixeira, e o lixo doméstico é despejado em uma área que recebe somente este tipo de lixo para ser posteriormente aterrado (Com. Pess. – SEMA/STM).

O chorume é coletado na parte baixa da lixeira pública, em duas piscinas de decantação, que não possuem canalização para o escoamento do líquido e não são impermeáveis, podendo este efluente infiltrar-se e assorear, alcançando os corpos d'água próximos. Isto se agrava em período chuvoso, pois as piscinas transbordam podendo atingir os igarapés que drenam a região e deságuam no lago Maicá (Com. Pess. – SEMA/STM). O que traz ameaças a saúde da comunidade que habita os arredores da área, como: a presença excessiva de roedores e urubus, e também através dos derrames do chorume nos igarapés o que impossibilita o uso destas águas, que comumente são utilizadas para banho, lavagem de roupa, e até mesmo o consumo, além da população sofrer com os fortes odores advindos da lixeira pública.

De acordo com a Lei nº 12.305/2010, que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), a lixeira pública do município de Santarém não atende os padrões de funcionamento, sendo classificado como lixão a céu aberto. A lei também visa no art. 9 que a gestão e gerenciamento dos resíduos sólidos deve seguir a seguinte prioridade: não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final adequada dos rejeitos. E no artigo 54, constitui-se a necessidade de substituir os lixões a céu aberto por aterros sanitários até o ano de 2014, sendo uma medida de proteção ambiental, que não foi cumprida pela maioria dos municípios brasileiros. Com isso, um projeto de Lei 2289/15 visa a prorrogação deste prazo até o ano de 2021 para que os municípios se adequem, sendo um instrumento essencial na busca de soluções para um dos mais graves problemas ambientais do Brasil.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DO CHORUME

O líquido percolado formado pela degradação e solubilização dos resíduos sólidos é chamado de chorume, isto ocorre devido a digestão anaeróbia da matéria orgânica por ação das exoenzimas que são produzidas pelas bactérias (FINCKLER, 2002). O potencial de geração do chorume depende do balanço de água no chorume, que corresponde a soma da quantidade de água que entra, e a subtração de água que sai, pelas reações químicas e vaporização, portanto, o potencial corresponde a quantidade de água que excede a capacidade de retenção da umidade na massa aterrada (HAMADA, 1997).

A sua composição química é variável, pois segundo Segato e Silva, (2000), existem fatores que interferem neste líquido, como: a composição do lixo, densidade, tratamento prévio, disposição dos resíduos, umidade, temperatura, profundidade e tempo. Estes autores também destacam os principais componentes deste líquido que são:

- Substâncias orgânicas calculadas pelos parâmetros de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e COT (Carbono Orgânico Total);
- Nitrogênio em forma de nitrogênio amoniacal, nitratos, nitritos e amônia;
- Halogênios inorgânicos, carbonatos, cloretos, sulfatos;
- Íons como: sódio, potássio, cálcio;
- E metais como ferro, zinco, manganês, níquel, cobre.

Os processos de reações bioquímicas que ocorrem em uma lixeira pública podem ser aeróbios e anaeróbios, o aterramento diário do lixo promove processos aeróbios, que pode durar de um dia a algumas semanas, até que seja consumido todo o oxigênio. Após isso, inicia-se a fase de degradação anaeróbia que é dividida em duas etapas, a primeira delas é chamada de “fermentação ácida”, os organismos facultativos ou anaeróbios decompõem as substâncias orgânicas iniciais, proteínas, graxas e hidratos de carbono, em CO₂ (gás carbônico), H₂ (gás hidrogênio) e ácidos graxos menores. Na segunda etapa, conhecida como “fermentação metanogênica”,

organismos estritamente anaeróbios decompõem os produtos da fermentação ácida e os convertem em CH₄ (gás metano), substâncias húmicas e água, essas substâncias húmicas são responsáveis pela coloração encontrada no chorume (SEGATO & SILVA, 2000).

Devido a esta ampla diversidade de substâncias, o impacto ambiental causado por este líquido está relacionado a sua alta concentração de matéria orgânica, baixa biodegradabilidade e elevada presença de metais pesados e substâncias recalcitrantes. Por isso, quando o chorume alcança o meio ambiente, persiste por um longo período causando efeitos crônicos na biologia dos organismos (MACHADO, 2005).

2.3. TESTES DE GENOTOXICIDADE E ANORMALIDADES NUCLEARES USADOS COMO BIOMARCADORES

Os agentes genotóxicos possuem afinidades químicas com o material genético, causando quebra da molécula de DNA e formação de adutos, podendo resultar em mutações, caso estas alterações não sejam reparadas pelo sistema de reparo da célula, estas mutações quando fixadas são repassadas para as células filhas (VILCHES, 2009). São aqueles que interagem com o DNA e ou com componentes celulares (fibras do fuso) e enzimas como as topoisomerases. A genotoxicidade nada mais é do que a formação de adutos no DNA, lesões na fita do DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides-irmãs, sendo que a mutagenicidade é a indução de mutação ao nível gênico ou cromossômico. Enquanto os efeitos genotóxicos podem ser temporários, os efeitos mutagênicos são persistentes. Portanto, mutagenicidade é uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

O Teste do Micronúcleo (MN) descrito por Schmid (1975) e adaptado para peixes por Hooftman e Raat (1982), possui vantagens por sua simplicidade sendo uma das técnicas mais aplicáveis para identificar alterações genômicas e recomendado para estudos de monitoramento ambiental, com uso de peixes como bioindicadores (RUSSO

et al., 2004). De acordo com Al Sabti e Metcalfe (1995), os micronúcleos são formados a partir de fragmentos de cromossomos (ação clastogênica do agente genotóxico), ou cromossomos inteiros, (ação aneugênica do agente genotóxico), que não são incluídos no núcleo da célula no final da mitose, formando um corpúsculo de cromatina arredondado no citoplasma (Figura 2).

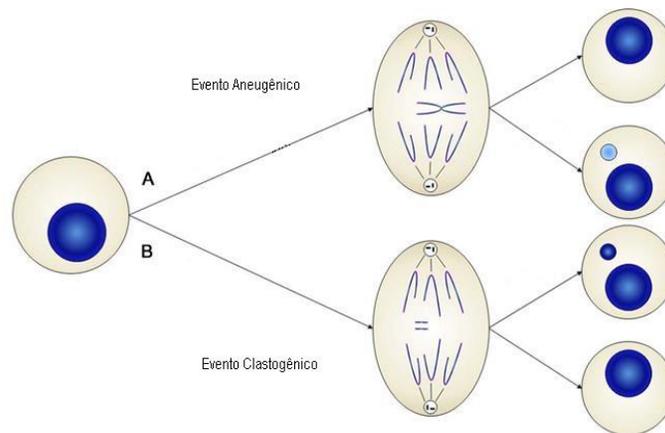


Figura 2: Formação do micronúcleo, por meio de evento aneugênico e clastogênico. Fonte: Terradas et al., (2010).

O teste MN vem sendo muito aplicado e é avaliado como um teste simples e efetivo para avaliar efeitos mutagênicos induzidos, quer seja por substâncias químicas ou amostras ambientais complexas. Isso se deve a capacidade do teste de avaliar a indução de quebras e/ou perdas cromossômicas, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Quanto as anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE), segundo Carrasco et al.,(1990), elas são classificadas como: *Lobed*: núcleo lobado, *Notched*: núcleo em forma de rim, *Vacuolated*: núcleo vacuolado e *Blebbbed*: núcleo segmentado. Essas anormalidades nucleares (Figura 3), podem ocorrer quando há um atraso de uma certa quantidade de material genético na fase mitótica, fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência em sua cromatina (BOMBAIL et al., 2001).

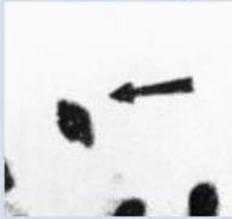
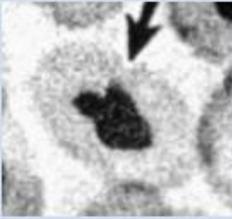
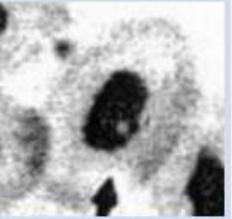
CATEGORIAS DE ANE	BLEBBED (núcleo segmentado)	LOBED (núcleo lobado)	NOTCHED (núcleo em forma de rim)	VACUOLATED (núcleo vacuolado)
ILUSTRAÇÃO				
DESCRIÇÃO De acordo com CARRASCO et al., (1990).	Núcleo com uma pequena evaginação da membrana nuclear.	Núcleo com evaginações maiores, formando vários lóbulos.	Núcleo com evaginação substancial bem definido e é delimitado por membrana nuclear.	Núcleo que apresenta uma região que lembra os vacúolos.

Figura 3: Categorias de Anormalidades Nucleares segundo Carrasco et al., (1990).

Micronúcleo e anormalidades nucleares são técnicas comumente utilizados como biomarcadores ou indicadores de genotoxicidade em peixes, provenientes ambientes contaminados (VILCHES, 2009; RUSSO et al., 2004; KIRSCHBAUM et al., 2009). O Ensaio Cometa também tem sido utilizado em estudos de poluição ambiental tendo peixes como bioindicadores (DUARTE et al, 2012; MASCHIO, 2009). E em estudos que averiguaram os efeitos do chorume em animais bioindicadores aquáticos, os testes citados, demonstraram sensibilidade e eficiência na investigação (DOS SANTOS, 2012; MACHADO, 2005).

A técnica utilizada para detectar lesões genômicas, passíveis de reparo, que após serem processadas podem resultar em mutação é o Ensaio Cometa (EC) “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (CONTIJO; TICE, 2003). Este ensaio é baseado no rompimento celular, no qual há o relaxamento do DNA, sendo possível observar após coloração, fragmentos de DNA advindos da quebra, causada pelos agentes genotóxicos, que ao serem submetidos à eletroforese ocorre a migração dos danos na molécula do DNA, formando uma “cauda” (PRETTI et al. 2007). Segundo Bucker et al, (2006) está técnica possui vantagens por detectar vários danos no DNA e por ser um ensaio com alta sensibilidade, sendo considerado em alguns casos mais sensível na detecção de agentes genotóxicos. Esta técnica possui grande aplicação para averiguar

a genotoxicidade de efluentes industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparos na fita do DNA, e biomonitorar as populações aquáticas (VILCHES, 2009).

A metodologia utilizada para avaliar os danos no DNA, é a da relação entre o raio do núcleo e a extensão das “caudas” formadas pela migração do material genético. Os núcleos das células são classificados em classes nas quais são: Classe 0, com núcleos sem danos e sem cauda; Classe 1, núcleos com uma cauda menor; Classe 2, núcleos apresentam cauda de tamanho 1 ou 2 vezes o diâmetro do núcleo; Classe 3, núcleos que apresentam cauda mais de 2 vezes o tamanho do núcleo e, Classe 4, célula possivelmente em apoptose (SILVA, 2007), Figura 4.

Imagem Observada	Classes de Danos
	0
	1
	2
	3
	4

Figura 4: Ranking das classes de danos ao DNA detectados por ensaio cometa. Fonte: adaptado de Valente et. al., (2017).

2.4. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS

Alterações na morfologia das brânquias assim como em outros órgãos como fígado e rim podem ser agregadas nos estudos sobre a toxicidade de substâncias químicas e no monitoramento dos efeitos agudos e crônicos, em ambientes aquáticos poluídos (LUPI, 2007). As brânquias, órgão que é responsável pela respiração da maioria dos peixes, também desempenha funções importantes como a osmorregulação e excreção (CAMPOS, 2007; FILHO *et al.*, 2014). Este órgão é o primeiro a entrar em contato com os poluentes presentes na água, sua multifuncionalidade e sua localização parcialmente no meio externo, faz com que represente um órgão alvo para o estudo da toxicidade em ambientes aquáticos (BARRETO, 2006; BALULA, 2011).

Este órgão é caracterizado por quatro arcos branquiais localizados ao lado de cada faringe, suportando filamentos (holobrânquias), que variam de número e comprimento de acordo com a idade e espécie do peixe, possui um epitélio fino que separa o sangue circulante da água, no qual é realizada várias funções como trocas gasosas, osmorregulação e excreção de produtos nitrogenados. O epitélio respiratório é formado por lamelas, e o não respiratório, por filamentos. As lamelas possuem duas camadas de células epiteliais fixas em uma membrana basal que envolve espaços vasculares formado pelas flanges das células pilares, que são responsáveis pela respiração do peixe (HENRIQUE, 2008).

Segundo Nilsson, (2007) as brânquias apresentam superfície favorável as trocas gasosas, mas pode também acarretar problemas incluindo fluxos energeticamente desfavoráveis de água e íons. Mudanças no ambiente como alterações no nível de oxigênio que provocam alterações na atividade do peixe geram dois ajustes nas brânquias, o primeiro é a mudança no fluxo de água nas brânquias, ou mudar o fluxo de sangue no interior das brânquias, recentemente um terceiro ajuste foi descoberto, no qual há uma remodelação da morfologia das brânquias.

Agentes estressores químicos, físicos ou biológicos induzem reações nos tecidos causando distúrbios circulatórios, como proliferação celular do epitélio filamentar e lamelar, aneurismas, fusão lamelar, além de processos inflamatórios que podem levar a necrose dos tecidos (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007; CANTANHÊDE *et al.*, 2014). Aneurisma é uma alteração que ocorre nos sinusóides branquiais e está associada a

traumas físicos ou químicos, formam-se após manejos mais severos e pode estar associada com lesões parasitárias, resíduos metabólicos ou contaminantes químicos (ISOBE, 2014). As lamelas quando muito afetadas a função respiratória pode ficar comprometida principalmente em temperaturas elevadas, em baixa concentração de oxigênio e a demanda metabólica é alta (SANTOS, 2010).

A fusão lamelar pode funcionar como um mecanismo de defesa, na qual há uma diminuição da área de superfície da brânquia ou, há um aumento na barreira de difusão ao agente poluente ou estressor, contudo, a maior dificuldade respiratória pode induzir à vasodilatação, levando ao aparecimento de edemas e descolamento do epitélio branquial (ERKMEN e KOLANKAYA, 2000).

As brânquias têm sido utilizadas em vários estudos como bioindicador de contaminação ambiental ou exposição a substâncias tóxicas em laboratório (LUPI, 2007; FILHO 2014; PEREIRA, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2011; GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007; ALBINATI *et al.*, 2009; VIRGENS *et al.*, 2015; CANTANHÊDE *et al.*, 2014). Deste modo, alterações na morfologia das brânquias apresenta-se como uma ferramenta fundamental no diagnóstico e respostas fisiológicas do peixe quando expostos a ambientes contendo substâncias tóxicas (ROMÃO *et al.*, 2006).

2.5. HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO

O fígado de peixes é um órgão chave, como em outros vertebrados, controla muitas funções vitais e possui importante papel na fisiologia do animal (BOMBONATO, 2007). É um órgão altamente irrigado, que possui funções de processar e armazenar os nutrientes absorvidos no trato digestivo e de neutralizar, eliminar substâncias tóxicas e secreta a bile, síntese e secreção de proteínas, metabolismo e a desintoxicação de drogas lipofílicas, a síntese e secreção de lipoproteínas, produção de uréia a partir de íons de amônio (CAMPOS, 2012; CAMPOS, 2007). Ele é compacto, localizado na cavidade celomática, ventralmente, seu tamanho, forma e volume estão adaptados ao espaço utilizado pelos outros órgãos viscerais e varia muito entre as espécies (COSTA, 2012). Formado por placas celulares circundados por sinusóides em torno da veia centro lobular, e cada placa apresenta hepatócitos com uma face sinusoidal para

absorção e uma face biliar para excreção (ROCHA, 2010). As particularidades quanto ao arranjo, e a disposição dos três lobos variam entre diferentes espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (BOMBONATO et al., 2007).

Compostos potencialmente tóxicos sofrem transformações que ocorrem em todos os tecidos do corpo, mas a grande maioria das reações que envolvem enzimas que metabolizam substâncias tóxicas são encontrados no fígado (STERZELECKI, 2006). A histopatologia do fígado em peixes é um dos marcadores mais confiáveis, utilizado como uma ferramenta de monitoramento em estudos de impacto ambiental (FERNANDES *et al.*, 2008).

Os hepatócitos, células formadoras do tecido hepático, são células com um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente, citoplasma com granulações e aspecto vacuolizado, o citoplasma dos hepatócitos é variável, pois depende do estado nutricional do organismo (FILHO, 2014). Eles são considerados os primeiros alvos da ação de uma substância tóxica, caracterizando assim o fígado como um biomarcador de poluição ambiental (ISOBE, 2014). Alterações no tecido por substâncias tóxicas congestão, necrose focal e hemorragia, puderam ser visualizadas, por exemplo, no estudo de Albinati *et al.*, (2009) que objetivou verificar os efeitos da toxicidade crônica do herbicida Roundup.

Outras alterações histológicas como hepatócitos com núcleos deslocados para a periferia, alguns núcleos vacuolizados ou em início de vacuolização, e citoplasmas com início de vacuolização foram visualizado no trabalho de Pereira, (2014), que objetivou utilizar o fígado como biomarcador em peixes nativos da fauna brasileira, após a exposição a contaminantes urbanos, dentre eles os detergentes biodegradáveis.

2.6. OS PEIXES DO GÊNERO *Hyphessobrycon*

O gênero *Hyphessobrycon* Durbin (1908), compreende cerca de 125 espécies válidas de peixes pertencentes a família Characidae, ordem Characiformes. São peixes de pequeno porte, conhecidos como tetra-americanos (Figura 5). Possuem valor comercial, pois são usados como peixes ornamentais, devido suas cores brilhantes, diversidade de formas, comportamento pacífico (BERRA, 2001). Aproximadamente um

terço das espécies de *Hyphessobrycon* Durbin é de interesse comercial, tendo em vista seu colorido exibido pelas espécies na aquariofilia (PAZ, 2012). Estão distribuídos do sul do México até o Rio da Prata na Argentina, alcançando sua maior diversidade no norte da América do Sul (INGENITO; LIMA; BUCKUP, 2013; LIMA; MOREIRA, 2003).



Figura 5: Aspectos da morfologia externa de *Hyphessobrycon heterorhabdus*, Ordem Characiformes. Fonte: Acervo LGBio-UFOPA.

Espécies do gênero *Hyphessobrycon* já foram utilizadas em estudos de toxicidade por contaminantes ambientais e demonstraram bom desempenho como organismos experimentais, pois possuem características como fácil disponibilidade, boa sensibilidade e suscetibilidade às respostas aos toxicantes e excelente adaptação a condições laboratoriais (DAMATO; BARBIERI, 2012; SOUZA, 2012; SCALON et al., 2010; SOTERO-SANTOS; ROCHA; POVINELLI, 2007; CARRASCHI, 2011).

Segundo Costa et al., (2008) organismos aquáticos utilizados em testes ecotoxicológicos devem apresentar características importantes como: elevada seletividade aos contaminantes, alta abundância e disponibilidade, estabilidade genética nas populações, representatividade no seu nível trófico e na área de estudo, ampla distribuição, valor comercial, fácil cultivo e adaptação às condições laboratoriais.

Cruz (2006) analisou a biodiversidade de peixes em quatro igarapés presentes nas proximidades da lixeira pública de Santarém, foi observado maior abundância de peixes do gênero *Hyphessobrycon heterorhabdus*, uma das razões pelas quais a pesquisa tomará estes peixes como organismo bioindicador.

3- OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis efeitos da exposição ao chorume proveniente da lixeira pública de Santarém – PA, em peixes do gênero *Hyphessobrycon heterorhabdus* do igarapé Cararazinho.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos genotóxicos do chorume, com base na frequência de micronúcleo, anormalidades nucleares e ensaio cometa em eritrócitos de peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*;
- Comparar os grupos expostos à água do igarapé e a diferentes concentrações de chorume a partir dos biomarcadores genotóxicos e histológicos nos peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*;
- Analisar alterações histopatológicas de brânquias e fígado em peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*, possivelmente associadas a poluentes aquáticos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do chorume foi realizada na área da lixeira pública da cidade de Santarém – PA (Figura 6). E a coleta dos peixes do gênero *Hyphessobrycon heterorhabdus* realizada, nas proximidades desta área, no igarapé Cararazinho (S 2° 31' 54.78"; W 54° 38' 31.27"). Ambas coletas foram realizadas em 06/04/2018, período chuvoso da região amazônica.



Figura 6: Localização da lixeira pública de Santarém delimitada pela linha amarela. Leito do Igarapé Cararazinho (linha azul). Estrada de acesso a comunidade Miritituba (linha branca). Em destaque: Mapa do Brasil, Estado do Pará, com a área de estudo no retângulo branco. Fonte: Google Earth.

4.1 COLETA DO CHORUME

A coleta do chorume foi feita nos pontos de derrame de chorume da lixeira pública do município, colocados em vidros âmbar de 1L, e armazenados em condição refrigerada, para serem posteriormente utilizados nos experimentos.

Os vidros âmbar foram anteriormente higienizados de acordo com o protocolo adaptado, baseado no Guia Nacional de Coletas e Preservação de Amostras, da Agência Nacional de Água (ANA), 2011, intitulado “Água, sedimento, comunidades

aquáticas e efluentes líquidos”. Para a higienização dos vidros âmbar foram preparadas soluções de limpeza que continham 990 ml de água destilada e 10 ml de EXTRAN (detergente neutro), que eram colocadas nos vidros, deixando agir por 24 horas. Após isto, era descartada a solução, e logo em seguida feita a lavagem do vidro com água corrente, posteriormente os vidros foram encheidos com água destilada e colocados em repouso por 24 horas. No dia seguinte, houve o despejo da água destilada, e com vidro devidamente limpo, sem líquido, foi deixado na estufa a 37°C, por 24 horas. Quando secos, houve a vedação das tampas com papel filme, para que não houvesse a entrada de qualquer sujeira no interior do vidro.

4.2 COLETA DOS PEIXES E ACLIMATAÇÃO

A coleta dos peixes foi realizada no igarapé Cararazinho pelo método de busca ativa, com uso de redes de arrasto e peneiras padronizadas. Foram coletados 30 peixes do gênero *Hyphessobrycon heterorhabdus* que posteriormente, foram transportados vivos em aquários ao Laboratório de Genética e Biodiversidade, da Universidade Federal do Oeste do Pará. Ainda no igarapé, houve a coleta de 36 litros de água em dois recipientes plásticos de 18L, sendo que esta água foi filtrada com filtro de pano de algodão para a remoção de detritos grossos. No laboratório, os animais foram aclimatados em aquários por 48 horas, contendo a água filtrada do igarapé, dotados de sistema de aeração constante, antes do início da exposição ao chorume. Os peixes foram mantidos sem alimentação desde a aclimatação até o fim do experimento.

4.3. EXPOSIÇÃO AO CHORUME

Após a aclimatação, os peixes foram divididos em cinco grupos sendo: um controle negativo (água filtrada do igarapé), um controle positivo, que foi utilizado a substância química benzeno, que mostrou ter efeitos genotóxicos de acordo com o trabalho de Bucker et al., (2006), e três tratamentos contendo a água do igarapé filtrada contendo diferentes concentrações de chorume que seguiram as proporções: 10%, 5%

e 2%. Os animais foram colocados em tanques plásticos, sendo cinco espécimes em cada grupo, para serem expostos por um período de 72 horas (exposição aguda).

Em cada grupo continha 4L de solução teste, sendo: no controle negativo (T1) 4L de água filtrada do igarapé, no controle positivo (T2) tendo solução teste com 4,5 L de água filtrada e 500 ml de Benzeno (20 ppm), sendo que foi dividido 1L para a reposição da solução, a cada 24 horas de experimento. Para o tratamento com 10 % de chorume (T3), a solução continha 3,6L de água filtrada e 400 ml de chorume, no tratamento com 5% (T4), continha 3,8L de água filtrada e 200 ml de chorume, e no último tratamento com 2 % de chorume (T5), tinha 3,920L de água filtrada e 80 ml de chorume. Posteriormente, os peixes foram colocados um a um, em cada tanque plástico devidamente etiquetados, contendo as soluções teste. Após isso, foram feitas as soluções de reposição (1L) que seriam utilizadas para repor 400 ml da solução pois, a cada 24 horas do experimento houve a retirada de 400 ml da solução teste que era desprezada em um tanque de 500L, contendo água. Estas soluções de reposição seguiram as mesmas proporções das soluções testes.

Após as 72 horas de experimento os peixes foram imersos em água com gelo para serem anestesiados. Por conseguinte, eram pesados, medidos e identificados, para então serem obtidas as amostras de sangue, utilizadas nas técnicas do Micronúcleo, Anormalidades nucleares e Ensaio Cometa.

4.4. ACOMPANHAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICOS DOS AQUÁRIOS EXPERIMENTAIS.

As medidas das características físico-químicas da água foram efetuadas diariamente durante a execução dos testes experimentais. Os valores de pH, temperatura e condutividade elétrica foram obtidos com auxílio de uma sonda multiparâmetro da marca GEHAKA modelo SENSODIRECT 150.

4.5 PARÂMETROS GENOTÓXICOS E HISTOLÓGICOS

4.5.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO E ANORMALIDADES NUCLEARES

Após a exposição ao chorume foi realizada a coleta de sangue dos peixes, a partir da técnica adaptada baseada no protocolo do Laboratório de Genética e Biodiversidade (ARANHA, 2013), realizou-se um corte na parte ventral da região opercular, onde era despejada uma gota de heparina na cavidade, a qual diluía com o sangue, que era aspirado utilizando uma micropipeta de 20µl, e transferido para um tubo contendo 5µl de meio RPMI. Posteriormente, o sangue diluído no tubo, era gotejado nas lâminas previamente identificadas, com o uso de pipeta de 10µl, para a realização do esfregaço sanguíneo. Para cada exemplar foram feitas duas lâminas, sendo que em cada uma foram analisadas 1000 células, totalizando 2000 células, por peixe.

As lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, diluído em tampão fosfato a pH 6.8, por 12 minutos. O material sanguíneo foi analisado em microscópio de luz com aumento de 1000X, em teste cego, sendo contados 2000 eritrócitos policromáticos (PCE). Para identificação de micronúcleo foram consideradas as seguintes características: estrutura redonda, não refrativa, com cerca de 1/3 da área do núcleo e separadas do núcleo do eritrócito.

As categorias de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE): Blebbed, Lobed, Vacuolated, Notched e Binucleada, foram registradas nas mesmas lâminas preparadas para análise de micronúcleos, porém anotadas em separado. A frequência de micronúcleos foi feita a partir da tabulação de dados organizados em planilha, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Frequência de micronúcleo (\%)} = \frac{\text{Número de micronúcleos X 100}}{2000 \text{ eritrócitos}}$$

4.5.2. ENSAIO COMETA

Para esta análise, adotamos a técnica descrita por Silva (2007), onde as etapas iniciais até a imersão das lâminas em solução de lise celular foram processadas no Laboratório de Genética e Biodiversidade, da Universidade Federal do Oeste do Pará. Foram analisadas 100 células para cada animal, observadas em aumento de 400X, usando microscópio óptico convencional, classificando visualmente, de acordo com o comprimento da cauda em relação à cabeça do nucleóides, a classificação se dará em classes de danos de 0 a 4.

Para o ensaio cometa foi preparada uma pré-cobertura para as lâminas, com agarose 1,5 % (1,80 g agarose (normal) + 120 ml de PBS / pH 7,4), que era fervida em frasco de vidro. Após isso, as lâminas eram mergulhadas na pré-cobertura deixando a extremidade fosca de fora, posteriormente, eram deixadas para escorrer e secar à temperatura ambiente. Após a preparação das lâminas, era fervida a agarose “*low melting*” (0,15g + 20 ml PBS/ pH 7,4), e depois mantida em banho à 37°C (misturados 10 µl de sangue diluído em RPMI, coletado com heparina) e 95 µl de agarose *low melting*, essa mistura imediatamente era colocada sobre a lâmina com a pré-cobertura, e logo em seguida colocada sobre esta camada uma lamínula (grande), fazendo com que a mistura se espalhasse. Posteriormente, foram deixadas na bancada para solidificar por *overnight*. Ao perceber a solidificação do material, era feita a retirada das lamínulas e colocadas as lâminas em cubetas de vidro vertical, já com a solução de lise gelada (146,1 g NaCl (2,5M)+ 37,2 g EDTA (100mM)+ 1,2 g de TRIS (10mM)), no momento do uso foram adicionados 1% de Triton X-100 e 10% DMSO, protegida da luz (cubeta envolvida com papel alumínio), por pelo menos 2 horas ou *overnight*. Posteriormente, as lâminas eram depositadas em cuba horizontal de eletroforese, com tampão de eletroforese (300mM de NaOH/1mM de EDTA / pH >13) sobre estas, deixando de molho por 30 minutos, em ambiente refrigerado. Após isso, inicia-se a eletroforese em 25V e 300 mA por 30 minutos. Ao término da eletroforese eram

retiradas as lâminas e neutralizadas com o tampão neutralizador (48,5g de TRIS para 1 L de água destilada/ pH 7,5) por 5 min, e este procedimento foi repetido por 3 vezes.

Após isto, as lâminas eram lavadas por 2 vezes com água destilada, e deixadas para secar à 37°C, *overnight*. As lâminas secas eram colocadas em cubetas de vidro contendo solução fixadora (15% ácido tricloroacético + 5% sulfato de zinco (heptahidratado) + 5% glicerol e 1 litro de água destilada), por 10 minutos, depois lavadas por 3 vezes com água destilada, e deixadas para secar à 37°C, *overnight*. Após isso, as lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada, e depois disso colocadas em cubetas contendo a solução de coloração com nitrato de prata que consiste em: 66mL da solução de carbonato de cálcio a 5% (25g de carbonato de cálcio para 500ml de água destilada) e 34mL da solução para nitrato de prata (0,5g de nitrato de prata, 0,5g de nitrato de amônio, 1,25g de ácido tungstosalicílico e 0,75ml de formaldeído para 500ml de água destilada), à 37°C, em banho maria por 15 a 20 minutos, ou até a solução começar a escurecer. E novamente, as lâminas eram lavadas com água destilada por 3 vezes, posteriormente, foram pingadas sobre as lâminas a solução stop de coloração (ácido acético a 1%), por 15 minutos, e após isso lavadas por 3 vezes com água destilada. Finalmente, foram colocadas para secar em temperatura ambiente, que após estarem secas podem ser observadas ao microscópio.

Para cada animal foram analisadas 100 células em cada lâmina, que visualmente eram classificadas em classes de danos, de acordo com o comprimento da cauda em relação à cabeça do nucleóide. O índice de danos de DNA (ID) foi estipulado através do valor de SCORE/ID visual, calculado pelo número de cometas em cada classe multiplicado pelo valor da classe, de acordo com a fórmula abaixo (AZQUETA e COLLINS, 2014):

$$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$$

Onde n é o número de cometas em cada classe. E **ID**, corresponde ao índice de dano no DNA.

4.5.3. PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA DE BRÂNQUIAS E FÍGADO

Para os procedimentos histológicos, um arco branquial foi retirado de cada exemplar e imediatamente fixado durante 24h em solução de Bouim, após a fixação o material foi transferido para o álcool 70% no qual ficou armazenado até o processamento. No laboratório de Química Multidisciplinar da UFOPA foram realizadas todas as etapas de preparação histológica, seguindo o protocolo disponível no laboratório. Primeiramente, o material passou por uma desidratação de uma série de soluções de álcool com graduações crescentes (80%, 90%, 95%, 100%I, 100%II E 100%III), após a retirada do álcool 100%III diafanizar com xilol por duas vezes por 5 min cada, até o material ficar translúcido e, finalmente, inicia-se os banhos em parafina em estufa 60°, por duas vezes de 1h cada banho. Os blocos de parafina foram seccionados em série (5µm de espessura) com auxílio de micrótomo, os cortes em perfil sagital foram feitos em micrótomo modelo Leipzig, sendo que para cada animal foram produzidas quatro lâminas, contendo quatro cortes histológicos, que eram colocados em lâminas com solução de gelatina incolor em folha, seguidas de secagem em temperatura ambiente, durante 24h, após a secagem as amostras passaram por um processo de desparafinização utilizando xilol 100% 2 vezes de 5 min, uma série de álcoois (100%, 90%, 70% e 50%) por 3 min cada, e água destilada por 3 min, para então serem coradas com hematoxilina e eosina, sendo 30 segundos na solução de hematoxilina, lavagem por 1 min em água corrente, e 1 min na solução de eosina, lavagem por 1 min em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em água destilada por 3 min, para então passar pelo processo de desidratação em uma série de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%) por 3 min cada, e Xilol por 2 vezes de 5 min. Por fim, foram montadas as lâminas permanentes, onde era gotejada cerca de 3 gotas de Verniz Vitral (em substituição ao entellan e bálsamo do Canadá), para fixação do material que era coberto com uma lamínula, e deixadas a secar em temperatura ambiente por 24 horas antes de analisá-las. Para cada peixe, foram feitas 4 lâminas, sendo uma delas a lâmina teste para coloração, tanto para o tecido branquial quanto para o hepático, e em cada lâmina tinham quatro cortes histológicos dos tecidos em

questão. As lâminas foram analisadas em microscópio (ZEISS - Axio modelo: AGmbH37081) acoplado com sistema de captação de imagem (ZEISS – modelo: Axio Cam Erc 51) em objetiva de 400x, para a retirada de fotografias.

As alterações histológicas branquiais foram avaliadas pelo cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH), usado e adaptado por Cantanhêde, et al., (2014), Nogueira et al., (2011) baseado em Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994), considerando a severidade de cada lesão. Há uma classificação para estas alterações em fases progressivas de danos nas brânquias: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis.

Para cada peixe foi calculado o valor do IAH através da fórmula:

$$\text{IAH} = 1 \times \Sigma \text{ I} + 10 \times \Sigma \text{ II} + 100 \times \Sigma \text{ III}$$

Sendo que *I*, *II* e *III* correspondem respectivamente a soma de cada tipo de alteração dos estágios I, II e III, cada alteração encontrada no corte histológico foi anotada, somada, e multiplicada ao seu respectivo estágio na fórmula. O valor médio do IAH foi dividido em cinco categorias: 0-10 = funcionamento normal do tecido; 11-20 = danificação leve para moderada do tecido; 21-50 = modificação moderada para severa do tecido; 51-100 = modificação severa do tecido; >100 = danificação irreparável do tecido, esta classificação é proposta por Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994), ilustrada na tabela 1.

Tabela 1: Valores dos índices das alterações com os efeitos nos órgãos. Fonte: Nogueira *et al.*, (2011).

Índices das alterações	Efeitos
0-10	Órgão com funcionamento normal
11-20	Órgão com alterações leves a moderadas
21-50	Órgão com alterações de moderadas a graves
>100	Órgão com danos irreversíveis

4.6. ANÁLISE DE DADOS

Dados primários dos parâmetros físico-químicos da água e as frequências de micronúcleo, anormalidades nucleares e índice de danos do ensaio cometa foram tabulados em planilha eletrônica com auxílio do programa Microsoft Excel, para a verificação de medidas de tendência central (média e desvio padrão).

As frequências de micronúcleo (MN) foram analisadas pelo teste de probabilidade condicional (PEREIRA 1991), admitindo o nível alfa de 5%, esta análise se ajusta aos fenômenos citogenéticos de baixíssima frequência, como é o caso de micronúcleos. Os dados ANE e ensaio cometa foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente testados por análise de variância não paramétrica Kruskal Wallis, para a comparação entre os grupos e tratamentos, admitindo o nível de significância $p \leq 0,05$, processadas no SoftWare BioEstat (versão 5.3) (AYRES, et al. 2007).

Na análise histopatológica de brânquias e fígados foi feita a frequência de cada alteração encontrada nos tecidos. Para os tecidos branquiais foram calculados os índices de alterações histológicas (IAH) por animal de cada tratamento, e verificada o valor médio do índice por grupo. A partir do valor médio dos índices de cada peixe, foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk), e após, realizado o teste de Kruskal Wallis para verificar a possível variância entre os tratamentos, assumindo nível de $p \leq 0,05$, as análises foram processadas no Software BioEstat (versão 5.3) (AYRES, et al. 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COLETAS E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES TESTES

Foi coletada uma amostra de aproximadamente 2L do líquido que vertia das piscinas de decantação da Lixeira Pública de Santarém, aqui denominado de chorume (Figura 7). A amostragem ocorreu no período chuvoso de 2018. Esse líquido apresentou coloração escura e odor característico de material em decomposição. Após a coleta o material foi acondicionado em caixas de isopor com gelo e transportadas para o LGBio-UFOPA e mantido sob refrigeração. No mesmo dia, pelo período da tarde, peixes da espécie *Hyphessobrycon heterorhabdus* foram coletados no Igarapé Cararazinho situado a jusante da LPS, em um ponto distante aproximadamente 2km do sítio de coleta do chorume (Figura 7). Parâmetros físico-químicos da água do igarapé Cararazinho foram registrados imediatamente antes da coleta de amostras e, os mesmos parâmetros foram monitorados nas soluções testes: água filtrada do igarapé, benzeno (20 ppm), chorume 10%, 5% e 2% a cada 24 horas durante o período experimental de 72h. Os valores médios registrados de pH, temperatura e condutividade elétrica são mostrados na tabela 2.

Os valores de pH tiveram pequena variação ao longo do experimento e se mantiveram em torno de 7.0 (pH neutro) nos aquários com solução de chorume, e ligeiramente alcalino (em torno de 8.0) nos aquários com água do igarapé e Benzeno. A temperatura se manteve estável em torno de 27°C em todos os tratamentos, variando menos de 1°C durante todo o experimento. O parâmetro condutividade elétrica, por sua vez, mostrou uma variação muito elevada com valores em torno de 25µS/cm nos tratamentos água do igarapé e benzeno 20ppm, enquanto que nos aquários contendo solução de chorume as medidas ficaram em torno de 0.5 µS, o que representa uma variação no fator de 50X. A condutividade elétrica é uma medida indireta da concentração de poluentes, podendo ajudar a detectar fontes poluidoras dos ecossistemas aquáticos e fornecer dados sobre o metabolismo do ambiente (DUARTE, 2012). Medidas acima de 100µS/cm geralmente indicam ambientes impactados e

valores altos podem também indicar características corrosivas da água (CETESBE, 2011).

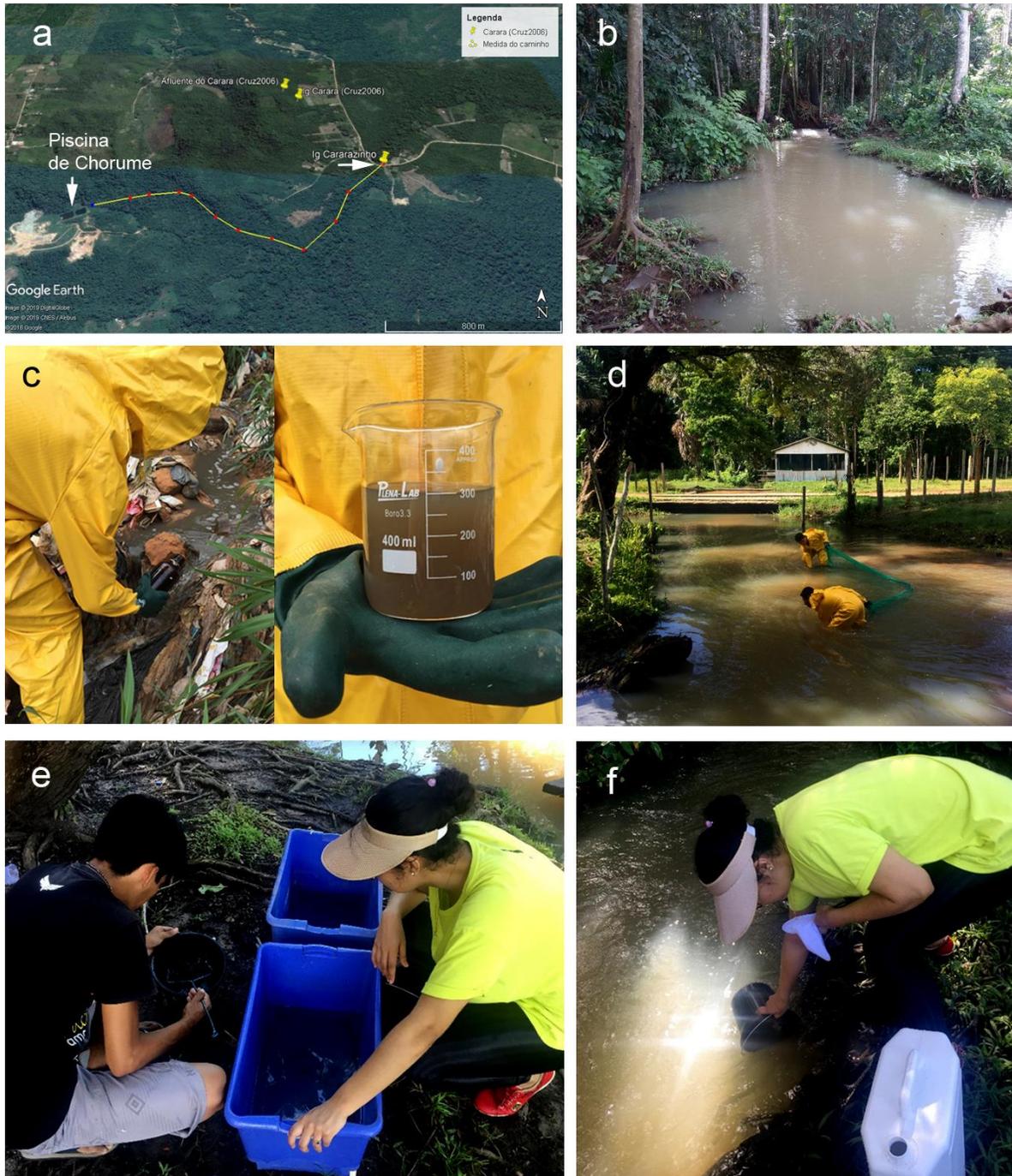


Figura 7: Localização e características dos locais de coleta de chorume da Lixeira Pública de Santarém (LPS) e de amostras (águas, peixes) do Igarapé Cararazinho, na área de influência da LPS. a) Pontos de coleta de amostras (setas) e curso estimado do igarapé (linha amarela); b) aspecto físico do igarapé Cararazinho no dia da coleta; c) coleta e coloração do chorume da LPS; d) coleta de peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus* no igarapé Cararazinho; e) acondicionamento de peixes para transporte ao laboratório; f) coleta de água do igarapé. Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão de medidas de parâmetros físicos nas soluções testes e controles utilizados para exposição e análise genotóxica de peixe *Hyphessobrycon heterorhabdus* do Igarapé Cararazinho, na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA.

Parâmetros	Tratamento Experimental				
	Água do Igarapé	Benzeno 20ppm	Chorume 10%	Chorume 5%	Chorume 2%
pH	8.25±0.31	8.05±0.21	6.69±0.27	7.03±0.35	7.13±0.22
Temperatura (°C)	26.80±0.42	26.63±0.41	27.00±0.29	27.13±0.62	27.05±0.59
Condutividade Elétrica (µS/cm)	27.13±7.35	22.45±4.37	0.59±0.26	0.31±0.14	0.17±0.06

Com base nos resultados dos valores de pH dos aquários contendo chorume a 10%, 5% e 2% ressalta-se que no tempo zero do experimento o pH tendeu ao ácido variando entre 6,5 e 6,8, e após as outras horas tendeu a neutro variando entre 7,0 e 7,3, isto demonstra que o chorume estava na fase metanogênica, pois segundo Hamada, (2005) se o chorume é coletado durante a fase ácida, o pH será baixo, porém parâmetros como DBO, COT, DQO, nutrientes e metais pesados podem apresentar valores elevados. Contudo, durante a fase metanogênica o pH varia entre 6,5 e 7,5 e os valores de DBO, COT, DQO e nutrientes serão significativamente menores. O chorume coletado apresentou coloração marrom escuro demonstrando a formação de substâncias húmicas e fase metanogênica, e sua composição depende da idade do aterro e dos eventos que ocorreram antes da amostragem (HAMADA, 2005).

De acordo com o Laudo Técnico de ensaios físico-químicos e microbiológico de águas do aterro não controlado do Perema (Lixeira Pública de Santarém) realizado pelo Laboratório de Química Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas – ICTA UFOPA, a análise de uma das piscinas de decantação do chorume mostrou pH=8.19 (ligeiramente alcalino), indicando que o chorume está na fase metanogênica. Outros parâmetros mostraram valores acima do permitido pela legislação (Portaria CONAMA 357/2005): turbidez, amônia, ferro, fósforo, fosfato, DBO e OD, além disso, foi registrada uma concentração de chumbo (Pb) 531 vezes acima do limite permitido (0.01mg/L) pela legislação brasileira vigente. Devido à grande concentração de matéria orgânica e despejos industriais a disposição de oxigênio é baixa, e o alto índice de DBO

observado é reflexo da maior atividade biológica no ambiente por conta de seu estado trófico. Altos valores de matéria orgânica podem levar à completa redução de oxigênio no ambiente aquático, provocando sérias alterações sobre a biota aquática (CETESB 2011; DUARTE, 2012).

Concomitante a isto, no período de coleta dos peixes realizado no início do mês de abril/2018, percebemos que a coluna d'água do igarapé não estava transparente, com muitas partículas em suspensão. No estudo de Cruz (2006) o resultado baseado nos parâmetros físico químicos associou a degradação dos igarapés próximos a LPS, ao recebimento de sedimentos provenientes da lixeira que compromete as formas de vida existentes, ainda ressaltou que o igarapé Carará apresentou nos meses de chuva aparência de cor parda e odor desagradável, o que foi constatado na presente pesquisa.

5.2. SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS

O experimento iniciou com quatro grupos (n=5) expostos a soluções de chorume a 20%, 10%, 5% e 2% e mais dois grupos controle nas soluções de Benzeno 20ppm e água natural filtrada do igarapé. Na primeira hora observamos mortalidade de 100% dos peixes expostos no tratamento chorume 20% (Figura 8). A partir de então o experimento continuou com apenas três grupos expostos ao chorume.

Durante o período de exposição por 72h foi observada apenas uma mortalidade ocorrida no tratamento chorume 10%. Também foi observado que os animais expostos ao chorume a 10%, apresentaram natação errática em círculos.



Figura 8: Espécimes de *Hyphessobrycon heterorhabdus* com mortalidade de 100% após menos de uma hora de exposição a solução de chorume 20% coletada da Lixeira Pública de Santarém. Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto aos peixes que sobreviveram, após a exposição de 72hr e anestesiados, foram identificados, medidos e pesados, e os valores médios do peso (em gramas) e o comprimento (em centímetros) dos peixes em seus respectivos tratamentos apresentaram os valores médios, na tabela 3. Os dados demonstraram não haver uma variação significativa entre as variáveis.

Tabela 3: Análise descritiva de peso e comprimento de *Hyphessobrycon heterorhabdus* do igarapé Cararazinho. N= número de peixes analisados, CMP= comprimento.

Tratamento	N	Valor médio Peso (g)	Valor médio Cmp (cm)
Água do igarapé	5	0.49	3.7
Benzeno (20 ppm)	5	0.53	3.7
Chorume 10%	4	0.45	3.5
Chorume 5%	5	0.42	3.4
Chorume 2%	5	0.37	3.2

5.3. MICRONÚCLEOS E ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS

Foi analisado um total de 38.000 eritrócitos de 19 exemplares de *Hyphessobrycon heterorhabdus* provenientes do Igarapé Cararazinho, divididos em 4 grupos tratamentos, um controle (água do igarapé) e três expostos (chorume 10, 5 e 2%). As frequências de células micronucleadas são mostradas na tabela 3. Considerando que o fenômeno de micronucleação é raro (PANTALEÃO, et al., 2006), para testar a hipótese nula de não variação da frequência de micronúcleo entre os grupos, foi comparado apenas o grupo exposto chorume 5% e uma categoria com os três subgrupos (água do igarapé, chorume 10 e 2%), visto que os grupos chorume 10 e 2% não mostraram diferença em relação a água do igarapé. (Tabela 4). Os valores obtidos pelo teste de probabilidade condicional demonstraram que o nível de significância descritiva foram respectivamente 18 e 41%, ficando acima do nível alfa previamente fixado em 5%, o que leva a não rejeição da hipótese nula, ou seja, a comparação não demonstrou variação significativa entre os grupos expostos.

Tabela 4: Frequência de micronúcleos em *Hyphessobrycon heterorhabdus* do igarapé Cararazinho, expostos ao chorume da lixeira pública de Santarém-PA. N= número de peixes por tratamento; MN= Micronúcleo; DP=Desvio padrão.

Tratamentos	Peixes	Células Analisadas	MN	MN (%)	DP	Variância
Água do igarapé	5	10000	1	0.01	0.02	0.0005
Chorume 10%	4	8000	1	0.01	0.02	0.0006
Chorume 5%	5	10000	4	0.04	0.04	0.0018
Chorume 2%	5	10000	1	0.01	0.02	0.0005

No presente estudo, os efeitos genotóxicos do chorume da LPS não mostraram uma aparente relação de dose-resposta, sendo pouco mais frequente nos exemplares de *H. heterorhabdus* expostos à concentração de 5%, porém tal variação não é

significativa entre os grupos. Na figura 9, é mostrada uma típica célula micronucleada da espécie observada no presente estudo.

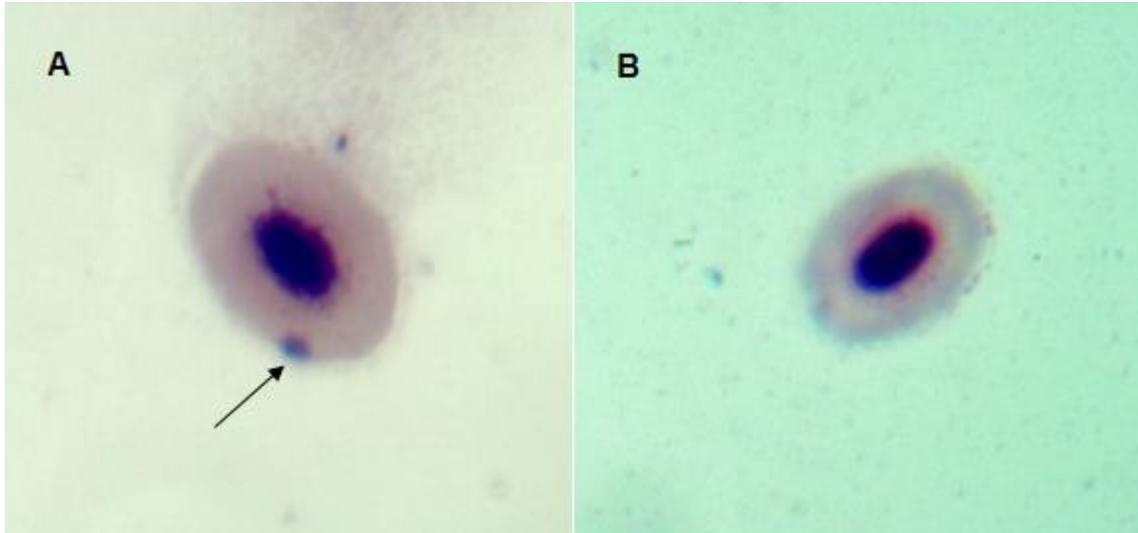


Figura 9: Eritrócitos de *Hyphessobrycon heterorhabdus* em distensão sanguínea corada por Giemsa. A) uma célula com micronúcleo (seta); B) célula sem alteração. Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto as anormalidades nucleares eritrocíticas foram observadas as cinco categorias de ANE descritas por Carrasco et al. (1990) no presente estudo, conforme ilustrado na figura 10. A categoria Lobed foi mais frequente, enquanto que Vacuoled foi a mais rara. Os valores de frequência média e desvio padrão para as categorias de ANE e respectivos tratamentos são apresentados na tabela 5. A comparação das frequências de ANE de cada tratamento, não apresentou diferença significativa ($p=0,447$; $H= 3,7077$).

Tabela 5: Frequência média e desvio padrão de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE) em *Hyphessobrycon heterorhabdus* do igarapé Cararazinho, expostos ao chorume a lixeira pública de Santarém-PA. Foram analisadas 2000 células por indivíduo.

Tratamentos	Blebbled	Lobed	Notched	Binucleate	Vacuoled	ANE Total
Água do igarapé	0.45±0.18	0.54±0.45	0.39±0.29	0.02±0.04	0	1,4
Chorume 10%	0.23±0.12	0.17±0.25	0.17±0.11	0.05±0.10	0.01±0.02	0,63
Chorume 5%	0.19±0.11	0.35±0.26	0,14±0.16	0.10±0.22	0	0,78
Chorume 2%	0.30±0.11	0.37±0.27	0.20±0.53	0.03±0.04	0	0,90

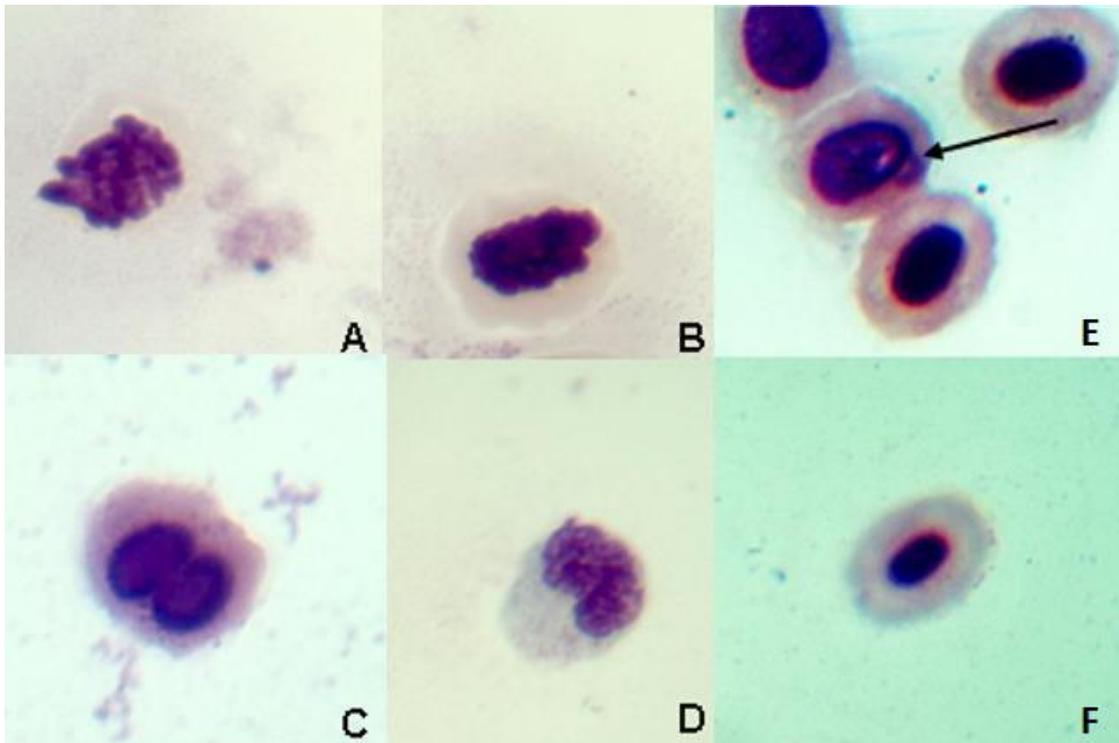


Figura 10. Eritrócitos de *Hyphessobrycon heterorhabdus* em distensão sanguínea corada por Giemsa. A) “Lobed”; B) “Blebbled”; C) Binucleate, D) “Notched”, E) Vacuolated (indicado por seta) e F) Célula normal. Visualização microscópica de 1000x. Fonte: Arquivo Pessoal.

Com base nos resultados das análises de MN e ANE podemos inferir que a água filtrada do igarapé evidenciou ter efeito genotóxico, já que os valores demonstraram não ser significativos quando comparado aos outros tratamentos. No estudo de Dos Santos (2012) observou aumento na frequência de ANE em peixes expostos à jusante do Lago Macurany, local próximo a LPP, o que nos permite inferir que ambientes aquáticos próximos a áreas de despejo de resíduos (lixo) são afetados com a contaminação da degradação da matéria, pois nestas lixeiras públicas não há forma adequada de tratamento para os resíduos depositados.

Nas categorias de anormalidades nucleares eritrocíticas a categoria Lobed foi a mais frequente, seguida pela categoria Blebbed, Notched, Binucleate e Vacuolated, que também foram visualizadas no estudo de Maschio, (2009) no qual buscou avaliar o possível potencial mutagênico e genotóxico dos químicos contidos nos efluentes domésticos e urbano que são despejados ao longo do rio Preto, expondo *Oreochromis niloticus* por 72 horas na água coletada de diferentes pontos do rio em questão, frequências de ANE, foram significativamente, mais altas que o controle, para alguns

pontos e períodos estudados, sugerindo uma genotoxicidade dos compostos presentes nas águas deste rio, sob os organismos testados.

Os biomarcadores genotóxicos micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocíticas têm sido utilizadas em diversos estudos para averiguar os efeitos genotóxicos de contaminantes em peixes (DOS SANTOS, 2012; BUCKER et al., 2006; BOMBAIL et al., 2001; AYLLON & GARCIA-VAZQUEZ, 2000). Bombail et al., (2001) investigou alterações no DNA de *Pholis gunellus*, em ambientes contaminados e preservados de Firth of Forth, Scotland, usando a frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias no qual verificou alta frequência de ANE nas amostras advindas do ambiente contaminado por indústrias. Kirschbaum et al., (2009) avaliou respostas citogenotóxicas em eritrócitos de juvenis de *Centropomus parallelus* coletados nos estuários de Cananéia e São Vicente, tanto no inverno quanto no verão, foram pontuados anormalidades nucleares (ANE) e micronúcleos (MN). As taxas encontradas em São Vicente foram significativamente superiores aos encontrados em Cananéia, evidenciando que os níveis de poluição naquele estuário eram o suficiente para induzir danos genéticos, pois é um dos estuários que recebe múltiplas fontes de contaminação, como indústrias, de esgoto, águas pluviais drenagem, o porto de Santos/SP, bem como aterros ilegais e locais de despejo.

5.4. ENSAIO COMETA

Na avaliação de danos ao material genético detectado por ensaio cometa, analisamos uma amostra de 14 peixes, perfazendo um total de 1.400 células. Na tabela 6 são mostrados os resultados das médias de scores e desvio padrão das amostras.

Tabela 6: Média e desvio padrão dos escores de Índice de Danos no DNA revelados por ensaio cometa em peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus* do Igarapé Cararazinho na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA.

Tratamentos	Peixes	Células analisadas	SCORE ID \pm DP
Água do igarapé	5	500	97.8 \pm 15.1
Chorume 10%	3	300	97 \pm 19.3
Chorume 5%	3	300	101.6 \pm 4.04
Chorume 2%	3	300	100.3 \pm 3.05

Na figura 11 estão representadas os nucleóides “cometas” observados durante as análises de acordo com as classes 0, 1, 2, 3 e 4.

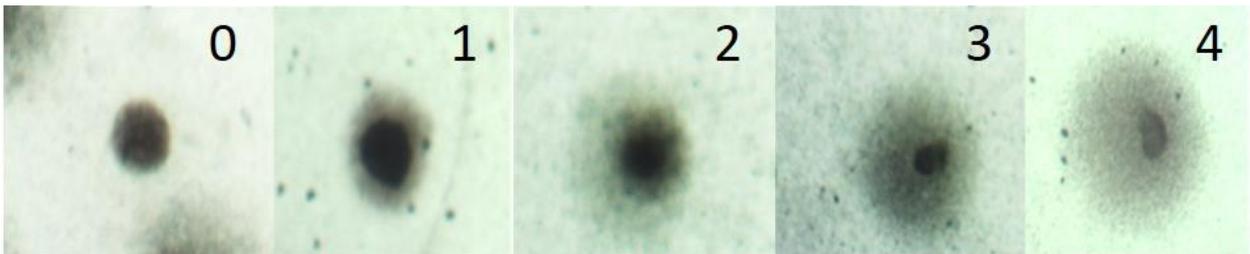


Figura 11: Classe de danos de DNA (teste do cometa) observados em eritrócitos de peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus*, expostos a diferentes concentrações de chorume da Lixeira Pública de Santarém. Classe 0 (sem danos) (0), classe 1 (1), classe 2 (2); classe 3 (3) e classe 4 (dano máximo) (4). Fonte: Arquivo pessoal.

Os danos genotóxicos revelados pelo ensaio cometa não mostraram variação significativa entre os diferentes grupos de tratamentos ($p=0.8964$; $H: 1.0863$). Apesar de que o tratamento que induziu o maior índice de danos foi chorume 5% ($ID= 101.6$), e o menor ID se observou nos peixes expostos ao chorume 10% ($ID=97$). É amplamente conhecido o efeito indutor de danos genotóxicos em peixes expostos a poluentes aquáticos, portanto, presume-se que os efeitos genotóxicos observados em *H.*

heterorhabdus do igarapé Cararazinho podem ter uma origem associada a presença de agentes genotóxicos em suas águas e que possivelmente derivam de material carregado a partir da Lixeira Pública de Santarém. Estudos adicionais da água natural do igarapé poderão lançar novos dados sobre essa questão e contribuir para se desenhar uma explicação mais robusta deste fenômeno.

Estudos como de Dos Santos, (2012), aplicou a técnica do cometa em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) para averiguar a genotoxicidade do chorume, e encontrou diferença significativa entre os tratamentos em relação ao controle. Isto pode ser explicada pela dosagem da substância que o animal foi submetido fazendo com que este provoque danos diretos ao DNA, e as proteínas do sistema de reparo (FERRARO *et al.*, 2004), ou ainda diferenças na idade e no sexo dos peixes expostos (LOPES-POLEZA, 2004).

Com base no Laudo Técnico de ensaios físico-químicos e microbiológicos de água da Lixeira Pública de Santarém, nas análises que foram realizadas em uma das piscinas de decantação de chorume constatou-se alto índice de chumbo (Pb), o que em possíveis extravasamentos de chorume alcance os corpos d'água que estão localizados ao redor da área da LPS. Este metal pesado pode ser um relevante causador de danos genotóxicos nos peixes presentes na biota aquática do igarapé citado, pois o chumbo segundo a pesquisa de Monteiro, (2009) ao avaliar o seu potencial genotóxico por meio de exposição de 6, 24 e 96h, na espécie *Prochilodus lineatus*, em concentrações de 0,48 mg.L⁻¹ Pb dissolvido em água, em comparação com água pura, e além de expor *in vitro* as células sanguíneas por 1, 3 e 6h, verificou por meio do ensaio cometa valores significativamente maiores do que seus respectivos controles negativos, concluindo assim que o chumbo se mostrou genotóxico para o *P. lineatus*, promovendo a fragmentação do DNA, este efeito genotóxico deve ser indireto, segundo o mesmo autor, pode ser advindo da ação das espécies reativas de oxigênio (EROS).

5.5. HISTOPATOLOGIA DE BRÂNQUIAS E FÍGADO

Nos tecidos branquiais dos 15 peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus* divididos nos cinco tratamentos: água do igarapé, benzeno (20 ppm), chorume, 10%, 5% e 2%, observou-se alterações morfológicas como: hiperplasia do epitélio filamentar, hiperplasia do epitélio lamelar, fusão incompleta e completa das lamelas secundárias e aneurismas lamelares, figura 12.

As alterações morfológicas branquiais mais frequentes nos 15 peixes deste estudo foram a hiperplasia do epitélio filamentar com frequência de 100%, hiperplasia do epitélio lamelar com 93,3% e aneurismas com 80%, sendo que estas alterações foram visualizadas em todos os tratamentos, logo em seguida temos as alterações fusão incompleta das lamelas secundárias com 60% e a completa com 46,6% das amostras analisadas, tabela 7.

Tabela 7: Frequência de alterações histológicas com respectivos estágios I, II e III encontradas nas brânquias de *Hyphessobrycon heterorhabdus* do igarapé Cararazinho, na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA.

Alterações Histológicas	Estágios	N Amostral	Frequência (%)
Hiperplasia do epitélio filamentar	I	15	100
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	14	93,3
Fusão incompleta das lamelas secundárias	I	9	60
Fusão completa das lamelas secundárias	II	7	46,6
Aneurisma lamelar	III	12	80

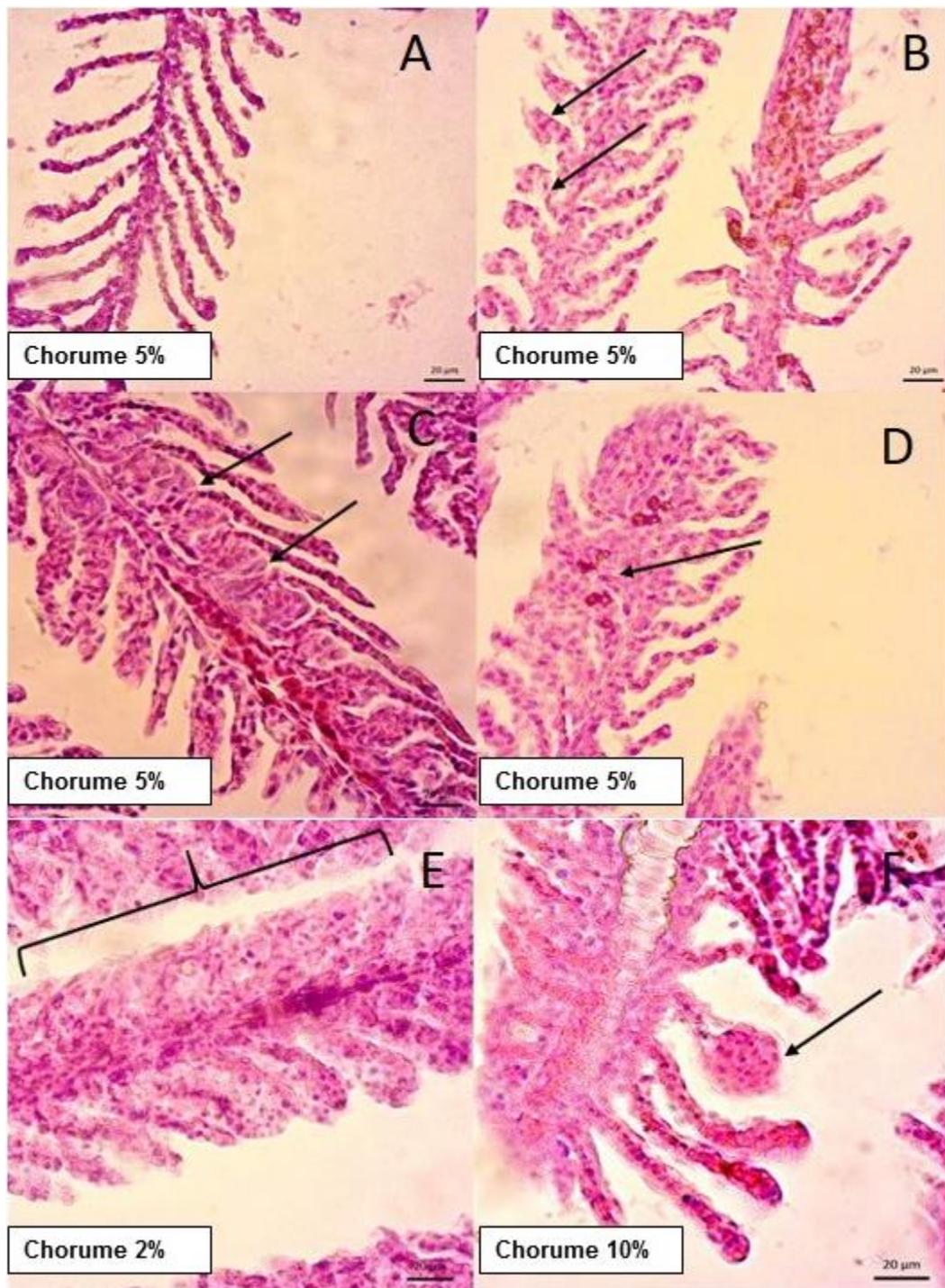


Figura 12. Cortes de filamentos branquiais dos peixes *Hyphessobrycon heteroharbdus*. A) Brânquias normais. B): brânquias com alterações: Hiperplasia do epitélio lamelar (setas); C) Hiperplasia do epitélio filamentar (setas); D) Fusão incompleta das lamelas secundárias (seta); E) Fusão completa das lamelas secundárias; F) Aneurisma Lamelar. Aumento: 400X. Escala 20 µm. Coloração HE. Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto os resultados sobre o Índice de Alteração Histológica (IAH) por indivíduo variou de 12 a 113, o valor médio do IAH do tratamento água do igarapé foi de 102,8, o tratamento benzeno teve valor médio IAH de 106, e o tratamento chorume 5% e 2% apresentaram valor IAH médio de 106,3 e 112,3, respectivamente, demonstrando que as brânquias dos indivíduos amostrados apresentaram, segundo classificação proposta por Poleksic e Mitrovic – Tutundzic (1994), alterações severas, danos irreversíveis no tecido. Somente o tratamento chorume 10% o valor médio foi de 79 demonstrando que as brânquias apresentaram alterações moderadas a severas. Para avaliarmos uma possível diferença significativa entre os tratamentos foi realizado o teste Kruskal Wallis para dados não paramétricos, no qual revelou ($p=0.3316$; $H= 4.5936$) demonstrando que não houve diferença.

A fusão lamelar e a hiperplasia dos epitélios filamental e lamelar são alterações que podem funcionar como mecanismos de defesa, diminuindo a área de superfície da brânquia, aumentando a barreira de difusão ao agente poluente (ERKMEN & KOLANKAYA, 2000). A fusão lamelar é resultante da hiperplasia das células epiteliais das lamelas e filamentos branquiais, o grau da fusão depende da intensidade e da localização. É considerada incompleta ou parcial se a hiperplasia se restringir à base da lamela ou somente a uma porção das lamelas. Entretanto, se a hiperplasia estiver presente ao longo dos filamentos, a fusão será completa (CANTANHÊDE *et al.*, 2003), esta alteração dificulta a passagem da água entre as lamelas, prejudicando a respiração do peixe.

Outra alteração observada neste estudo foi o aneurisma lamelar que está relacionado a ruptura de células pilares resultando na perda da função de apoio (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007), isto pode ser causado por ação de contaminantes presentes na água, que sob exposição, pode levar a ruptura do epitélio e hemorragia, afetando as trocas gasosas nas brânquias.

Estudos como de Nogueira *et al.*, (2011) que avaliou a partir do índice de alterações morfológicas nas brânquias de *Pimelodus maculatus* uma possível contaminação de reservatório aquático em Minas Gerais, no qual observou todas as alterações como: fusão lamelar, aneurismas e hiperplasia do epitélio filamental e lamelar. Assim como no trabalho de Henares *et al.*, (2007), que objetivou estimar a

concentração letal do diquate (herbicida) em *Leporinus macrocephalus* e avaliar os efeitos histopatológicos na brânquia e no fígado dos peixes expostos a concentrações subagudas, no qual encontrou alterações consideradas reversíveis no tecido do peixe. Com base nesses estudos, podemos considerar que os danos teciduais encontrados em *H. heterorhabdus* são validados para avaliação da contaminação ambiental.

Quanto ao resultado das alterações histopatológicas dos tecidos hepáticos, foram analisados um total de 13 peixes divididos em cinco tratamentos: água natural do igarapé, benzeno (20 ppm), chorume, 10%, 5% e 2%, esta redução no número de peixes, deve-se a perda de material durante o processamento. Nestas amostras observou-se alterações como: Necrose, vacuolização, congestão vascular, deformação nuclear, degeneração citoplasmática e presença de parasito. Na tabela 8 são apresentadas as principais lesões encontradas no fígado.

As alterações mais frequentes foram a necrose, vacuolização e deformação citoplasmática, seguidas da congestão vascular, degeneração citoplasmática e parasito, que estão ilustradas na figura 13. No tratamento água natural do igarapé, benzeno (20 ppm), chorume 10% e 2% foi possível observar as alterações histopatológicas: necrose, deformação nuclear, vacuolização, congestão vascular e degeneração citoplasmática, estas mesmas alterações foram vistas no tratamento chorume 5%, porém a congestão vascular não foi observada. E apenas foi observado um parasito em um dos tecidos hepáticos do tratamento benzeno (20 ppm).

Lesões no parênquima hepático já foram associados à poluição ambiental de zona urbana e rural (NIMET, 2016; FILHO et al., 2014; DOS SANTOS, 2013; PINHEIRO et al., 2017; ROCHA et al., 2010), efeito de herbicidas (HENARES et al., 2007; ALBINATI et al., 2009; SILVA, 2015), detergente biodegradável (PEREIRA et al., 2014) e detergente de uso farmacêutico (BALULA, 2011).

Tabela 8: Frequências de alterações histopatológicas no fígado de *Hyphessobrycon heteroharbdus* do igarapé Cararazinho na área de influência da Lixeira Pública de Santarém-PA T1: água natural do igarapé, T2: benzeno 20 ppm, T3: chorume 10%, T4: chorume 5% e T5: chorume 2%. 0 ausente; + presente; ++ frequente; +++ muito frequente.

Alterações Histopatológicas	T1 N:3	T2 N:3	T3 N:2	T4 N:3	T5 N:2
Necrose	+++	++	++	+++	++
Vacuolização	++	+++	++	+++	++
Congestão Vascular	+	++	+	0	++
Deformação nuclear	+++	+++	++	+++	++
Degeneração citoplasmática	0	+++	++	+	+
Parasito	0	+	0	0	0

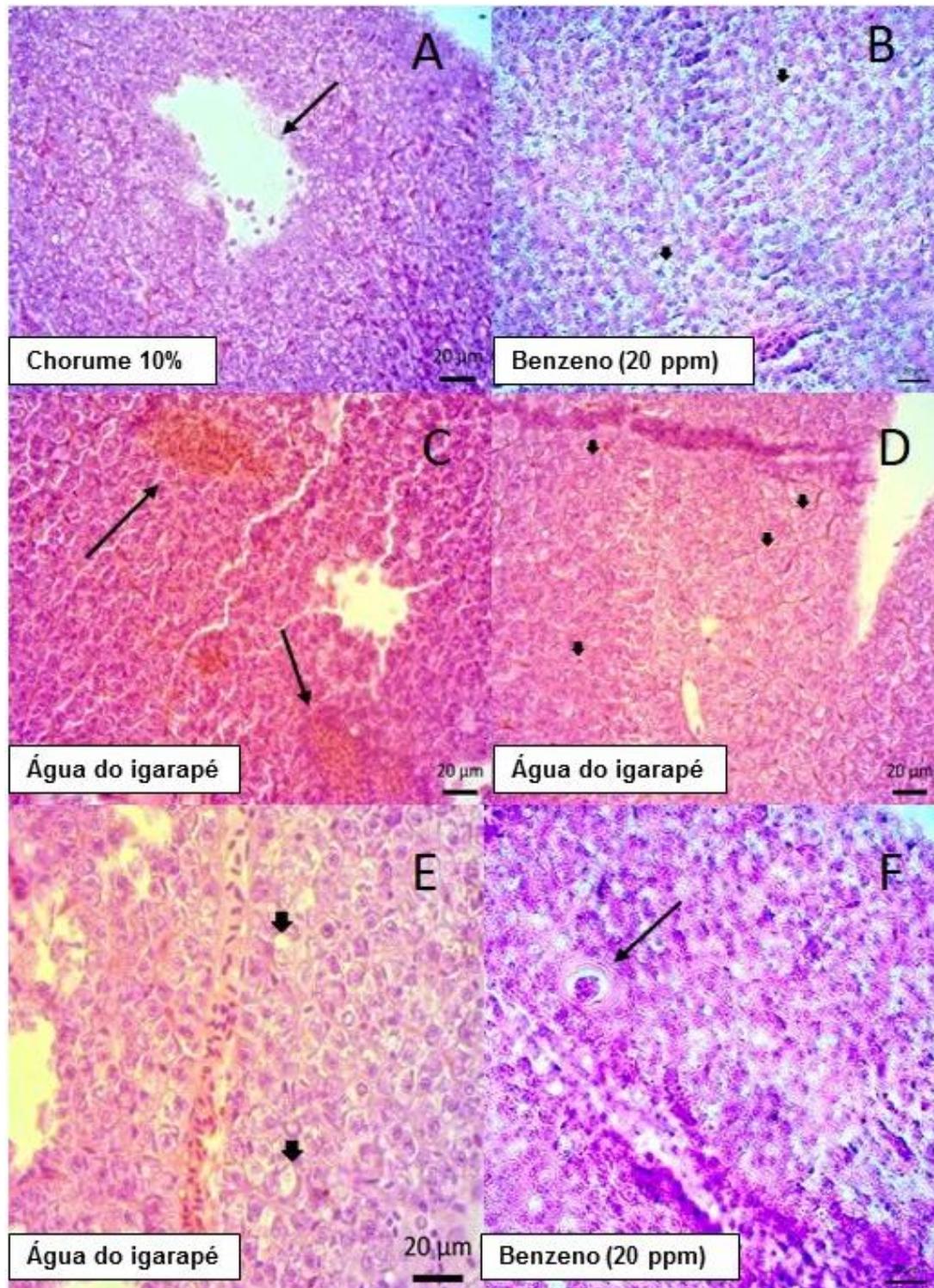


Figura 13. Cortes do tecido hepático dos peixes *Hyphessobrycon heteroharbdus*. A) Necrose (indicada pela seta) B) Vacuolização dos hepatócitos (setas); C) Congestão Vascular (setas); D) Deformações nucleares (setas); E) Degeneração citoplasmática (setas); F) parasito (seta). Aumento: 400X. Escala 20 µm. Coloração HE. Fonte: Arquivo pessoal.

A vacuolização e congestão vascular são alterações histopatológicas que também foram mais frequentes no estudo de Nimet, (2016) no qual avaliou o fígado e brânquias de *Astyanax bifasciatus* correlacionando a presença e o grau de alterações histológicas com as variáveis ambientais entre riachos, com diferentes usos e ocupação do solo, segundo este mesmo autor a vacuolização citoplasmática é resultado da deficiente metabolização de lipídeos, agregado com a inibição da síntese protéica e desagregação dos microtúbulos, podendo em casos mais avançados causar o deslocamento do núcleo dos hepatócitos para a periferia. Isto pode estar relacionado a erros que ocorrem nas funções de metabolização e excreção de substâncias no fígado, devido a agentes tóxicos combinados aos lipídeos do citoplasma, causando uma maior demanda de energia para reparar os danos causados por estes agentes toxicantes (LEE et al., 2012). Os hepatócitos vacuolizados podem ser um sinal de doenças degenerativas sugerindo que este processo de danos metabólicos está possivelmente relacionado a exposição a água contaminada (FERNANDES et al., 2008). A congestão vascular ocorre devido um acúmulo de sangue ocasionando uma dilatação dos vasos sanguíneos, esta alteração ocorre em presença de agentes tóxicos que aumentam a circulação sanguínea que conseqüentemente eleva o número de células imune para o local (SANTOS et al., 2004).

A necrose uma histopatologia frequente neste estudo também foi presente nos trabalhos de Pinheiro et al., (2017), e Rocha et al., (2010) onde destacou que ela pode ocorrer por várias causas, como a transformação de um contaminante em um metabólito tóxico que tem incluído em sua estrutura, um radical livre ou oxigênio reativo, resultando em lesão peroxidativa dos lipídios da membrana e conseqüentemente a necrose. As alterações regressivas, como degeneração e necrose, são processos nos quais há redução ou perda das funções do órgão (BERNET et al., 1999). A degeneração citoplasmática leva à perda da forma dos hepatócitos, causando o desarranjo na estrutura do tecido causando danos celulares e a diminuição no número de hepatócitos, resultando em perdas funcionais e estruturais no fígado dos peixes (STENTIFORD et al., 2003).

Outra histopatologia encontrada em todos os tecidos hepáticos dos peixes deste estudo foi a deformação do núcleo que pode trazer lesões drásticas na organização das

organelas acarretando efeitos graves no metabolismo do órgão. Esta alteração histopatológica também foi observada na pesquisa de Silva (2015), que buscou avaliar a toxicidade do herbicida, o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), por meio da análise de fígados de peixes *Oreochromis niloticus*, expostos a diferentes diluições, além destas alterações foram observadas outras como: a perda da integridade citoplasmática e do limite celular, citoplasma vacuolizado, desorganização do tecido e degeneração hidrópica.

O estudo de Albinati *et al.*, (2009) avaliou o uso de brânquias, fígado e rins como biomarcadores histológicos em ensaio de toxicidade crônica com o herbicida Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*) e o fígado foi considerado um bom biomarcador histológico para a contaminação aquática. No estudo de Stentiford *et al.*, (2003) que objetivou relatar as alterações histopatológicas em tecidos, como o fígado, de três espécies de peixes estuarinos (*Platichthys flesus*, *Pomatoschistus minutus* e *Zoarcetes viviparus*), capturados de quatro estuários britânicos (Tyne, Tees, Mersey e Alde), diferentemente impactados por contaminantes, incluindo os PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), ressalta que o registro de lesões no fígado estão associados com a contaminação dos estuários, e que a avaliação desses efeitos biológicos é uma poderosa ferramenta para a inferência dos impactos a ictiofauna causados pelos contaminantes no ambiente aquático.

Diante dos resultados obtidos das análises de biomarcadores genotóxicos e histológicos podemos inferir que por não haver valores significativos quando comparados os diferentes tratamentos de chorume com a água do igarapé cararazinho, pode-se inferir que o igarapé cararazinho esteja recebendo contaminantes advindos de extravasamentos de cargas de chorume da Lixeira Pública de Santarém, pois a mesma dispõe de uma barreira de contenção eficiente, bem como de tratamentos eficazes para os resíduos ali depositados.

Portanto, com base nesses resultados é importante a análise das águas do igarapé Cararazinho, para haver uma inferência das substâncias que estejam causando danos genotóxicos e histológicos na biota aquática. Além de que, esta análise trará benefícios para a população que habita os arredores do igarapé, proporcionando

conhecimento para saber se a mesma pode continuar sendo usada para balneabilidade, e uso doméstico.

8. CONCLUSÕES

Com os presentes resultados obtidos da análise genotóxica das células sanguíneas e a análise histopatológica de brânquias e fígado de peixes *Hyphessobrycon heterorhabdus* expostos a diferentes concentrações de chorume da lixeira pública de Santarém- PA, concluímos que:

- A espécie *Hyphessobrycon heterorhabdus* apresentou potencial positivo para ser utilizada como organismo teste em bioensaios relacionados a poluição hídrica em igarapés;
- É possível inferir que a água natural do igarapé Cararazinho possui potencial genotóxico o mesmo observado nos tratamentos de chorume diluído a 2, 5 e 10%;
- Os peixes expostos ao chorume da LPS e a água do igarapé Cararazinho desenvolveram diversas patologias dos tecidos branquial e hepático, o que pode estar relacionado com a exposição aos poluentes aquáticos presentes nestas águas;
- É importante a análise das águas do igarapé Cararazinho para a inferências das substâncias que estejam causando danos genotóxicos e histológicos nos peixes, e para conhecimento da população que usa a água para fins de balneabilidade e domésticos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10004**: Resíduos sólidos – classificação. São Paulo, 2004.

ALBINATI, R. C. B., MOREIRA, E. L. T., CARVALHO, J. V., DE LIRA, A. D., SANTOS, G. B., VIDAL, L. V. O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.61, n.3, p.621-627, 2009.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in Water.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 467, n. 2, p. 177-186, 2000.

AYRES, M., AYRES, JR. M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. BioEstat. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências médicas**, v. 5, 2007.

AZQUETA, A., COLLINS, A.R. **The Comet Assay: High Throughput use of FPG**. In: SIERRA, L.M., GAIVÃO, I. Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach. New York Humana Press Springer. p.199 – 218, 2014.

BALULA, T. L. A. **Avaliação dos efeitos histológicos ao nível das brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcônio**. 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

BARRETO, T. D. R. **Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600BR®).** Dissertação (mestrado). 92 f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., & WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis**, v.22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BERRA, T. M. **Freshwater fish distribution.** Academic Press, 2001. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books>> Acesso em: 25 nov. 2017.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, pp. 453-460, 2000.

BOLOGNESI C.; HAYASHI M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**. Oxford. v. 26 no. 1 pp. 205–213, 2011.

BOMBAIL, V., AW, D., GORDON, E., BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BOMBONATO, M. T. S., ROCHEL, S. S., VICENTINI, C. A., BASTOS, F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v.29, n. 1, p. 81-85, 2007.

BRASIL. Lei n. 12.305, de 2 de agosto de 2010. **Política nacional de resíduos sólidos.** – 2. ed. – Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, 73 p. 2012.

BUCKER, A., CARVALHO, W., ALVES-GOMES, J. A. Avaliação de mutagenicidade e gentotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposto a benzeno. **Acta amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

CAMPOS, D. Y. F. **Análise das respostas citogenotóxicas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto à água do mar diante da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz, Ilha Rei George, Antártica.** 2007. 112 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências – Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CAMPOS, V. E. W. **Análise do fígado de peixes da espécie *Prochilodus lineatus* de ambientes alterados, quantificada pelo Image J.** 2012. 38 f. Monografia. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

CANTANHÊDE, S.M.; MEDEIROS, A.M.; FERREIRA, J.R.C.; ALVES, L.M.C.; FERREIRA, F.S.; CUTRIM, M.V.J.; SANTOS, D.M.S. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís—MA. **Arq. Bra. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 2, p. 593–601, 2014.

CARRASCHI, S. P., CUBO, P., SCHIAVETTI, B. L., SHIOGIRI, N. S., CRUZ, C. D., PITELLI, R. A. Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 2, p. 191-196, 2011.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assesment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v 47, p. 2123-2136, 1990.

CAVALCANTE, A. L. M. **Parâmetros sanguíneos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no monitoramento ambiental do chumbo.** 2009. 70 f. Dissertação (mestrado). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – Fundação Oswaldo Fio Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

CELERE M. S., OLIVEIRA A. S., TREVILATO T. M.B., MUÑOZ S. I. S. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v 23, n 4, p 939-947, abr, 2007.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Organizadores: BRANDÃO, C. J. BOTELHO, M. J. C., SATO, M. I. Z., LAMPARELLI, M. C. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

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

COSTA, G. M. ORTIS, R. C., DE LIMA, M. G., CASALS, J. B., DE LIMA, A. R., KFOURY JR, J. R. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 947-950, 2012.

CRUZ, R. M.; GOCH, Y. G. H. **A comunidade de peixes como bioindicadora da qualidade da água de igarapés da bacia do Maicá, próximos ao aterro sanitário do município de Santarém – Pará**. 2006, 27 f. Monografia – Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Santarém, 2006

DA CRUZ, C., CUBO, P., GOMES, G. R., VENTURINI, F. P., GUILHERME, P. E., & PITELLI, R. A. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. **J. Braz. Soc. Ecotoxicology**, v. 3, n. 1, p. 53-55, 2008.

DA JANSEN, L. Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico. **Arq. Bras. Med**, v. 66, n. 2, p. 593-601, 2014.

DA SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, p. 30-37, 2007.

DAMATO, M.; BARBIERI, E. Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. **Mundo Saúde**. v. 36, n. 4, p. 574-81, 2012.

DE SOUZA, P. J. **Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros (*Simocephalus serralatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*)**. 2012, 140 f. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em ecologia e recursos naturais da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2012.

DEARFIELD, K. L., CIMINO, M. C., MCCARROLL, N. E., MAUER, I., VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, n. 1, p. 121-135, 2002.

DHAWAN, A., BAJPAYEE, M. and PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v 25, p. 5-32, 2009.

DOS SANTOS, D. R. **Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna**. 2013. 94 f. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DOS SANTOS, I.C.C. **Biomarcadores de efeito do chorume da lixeira pública de Parintins-Am em tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2012. 111 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas. 2012.

DUARTE, I. D., DIAS, M. C., DE OLIVEIRA DAVID, J. A., MATSUMOTO, S. T. A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 10, n. 2, p. 211, 2012.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kızılırmak River, Turkey. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 64, n. 3, p. 418-425, 2000.

FERNANDES, C. FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., ROCHA, E., SALGADO, M. A. Monitoring Pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 145, n. 1-3, p. 315-322, 2008.

FERRARO, M. V. M., FENOCCHIO, A. S., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, C. D. O., CESTARI, M. M. 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. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FILHO, F. M. S., F. M., REZENDE, K. F. O., EMERENCIANO, A. K., MOREIRA, L. M., VILA, V. B., BORGES, R. M., PRESSINOTTI, L. N. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **Atas de Saúde Ambiental-ASA**, v. 2, n. 1, p. 09-22, 2014. (ISSN 2357-7614).

FINKLER, R. **Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna***. 2002, 117 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

GARCIA-SANTOS, S., MONTEIRO, S. M., CARROLA, J., FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 376-381, 2007.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra**, p. 173-200, 2003.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n. 1, p. 153-164, 2003.

HAMADA, J., Estimativas de geração e caracterização do chorume em aterros sanitários. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19, 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1997. p. 1801 - 1810.

HENARES, M. N. P., DA CRUZ, C., GOMES, G. R., PITELLI, R. A., MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do diquate na brânquia e no fígado do piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 107-116, 2007.

HENRIQUE, H. S. **Aspectos fisioecológicos de *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus* (Teleósteos) do reservatório da UHE de Furnas, MG: avaliação morfofuncional das brânquias e variáveis hematológicas.** 2008. 165 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlo, São Carlos, 2008.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, v. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1982.

INGENITO, L. F. S.; LIMA, F. C. T., BUCKUP, P. A. A new species of *Hyphessobrycon* Durbin (Characiformes: Characidae) from the rio Juruena basin, Central Brazil, with notes on *H. loweae* Costa & Géry. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 1, p. 33-44, 2013.

ISOBE, H. N. C. **Análise da histologia hepática e branquial em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em diferentes densidades em tanques-rede, no Rio do Corvo, PR.** 2014. Tese (Doutorado). 50 f. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

KIRSCHBAUM, A. A., SERIANI, R., PEREIRA, C. D., ASSUNÇÃO, A., ABESSA, D. M., ROTUNDO, M. M., RANZANI-PAIVA, M. J. Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, SP, Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 151-154, 2009.

LEE, J. W., KIM, J. W., DE RIU, N., MONIELLO, G., HUNG, S. S. Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. **Aquatic toxicology**, v. 109, p. 90-99, 2012.

LEITE C.M.B., BERNARDES R.S.O., SEBASTIÃO A. Método Walkley-Black na determinação da matéria orgânica em solos contaminados por choro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v 8, n 1, p. 111 – 115, 2004.

LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LIMA, F. C. T.; MOREIRA, C. R. Three new species of Hyphessobrycon (Characiformes: Characidae) from the upper rio Araguaia basin in Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 1, n. 1, p. 21-33, 2003.

LOPES-POLEZA, S. C. G. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH₃Hg⁺) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios cometa e micronúcleo**. 2004. 70 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LUPI, C., NHACARINI, N. I., MAZON, A. F., RIGOLINSÁ, O. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Rev. Hispeci & Lema**, v. 3, n. 3, p. 1-6, 2007.

MACHADO, V. G. **Determinação do potencial tóxico e genotóxico de líquido percolado gerado em aterramento sanitário de resíduos sólidos urbanos.** 2005, 109 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

MASCHIO, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP.** 2009, 208 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2009.

MONTEIRO, V. **A exposição aguda ao chumbo induz danos no DNA de vários tecidos do peixe *Prochilodus lineatus*.** 2009, 73f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina. Paraná, 2009.

NILSSON, G. E. Gill remodeling in fish—a new fashion or an ancient secret? **Journal of experimental Biology**, v. 210, n. 14, p. 2403-2409, 2007.

NIMET, J. **Histopatologia em *Astyanax bifasciatus* (Garavello, 2010) como biomarcador para biomonitoramento de riachos com diferentes usos e ocupação do solo.** 2016. 38 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016.

NOGUEIRA, D. J., DE CASTRO, S. C., VIEIRA, R. C. A., DE SÁ, O. R., DE AZEVEDO SANTOS, V. M. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) (Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 51-58, 2011.

PANTALEÃO, S. M., ALCÂNTARA, A. V., ALVES, J. D. P. H., SPANÓ, M. A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 47, n. 3, p. 219-224, 2006.

PAZ, F. P. C. **Identificação molecular (DNA barcode) das espécies de *Hyphessobrycon* Durbin (Characiformes: Characidae) do Sistema Solimões/Amazonas.** 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 2012.

PEREIRA, B. F. **Análise dos efeitos da exposição a ambientes poluídos na morfologia e no envelhecimento precoce, de brânquias e fígado em peixes.** 2014. 117 f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

PEREIRA, C. A. B. Testes estatísticos para comparar proporções em problemas de citogenética. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação, Ver. Brasil. De Genética**, p. 113-121, 1991.

PINHEIRO, K. B. S., FERREIRA, R. L. S., DA MOTA, J. B., DA CUNHA, P. R. P., VIDEIRA, M. N. Histopatologia do fígado de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) proveniente de área sobre influência de mineração na Amazônia Oriental, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 74-78, 2017.

POLEKSIĆ, V., MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books**, p. 339-52, 1994.

PRETTI E.; CAVALCANTE D.; SIMONATO J. D.; MARTINEZ C. B. R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, VIII, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: VIICEB – Sociedade de ecologia do Brasil, 2007, p 1- 2.

ROCHA, R. M., COELHO, R. P., MONTES, C. S., SANTOS, S. S. D., FERREIRA, M. A. P. Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guajará, Belém, Pará. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 101-109, 2010.

ROMÃO, S., DONATTI, L., FREITAS, M. O., TEIXEIRA, J., KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 441-448, 2006.

RUSSO, C., ROCCO, L., MORESCALCHI, M. A., STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 57, n. 2, p. 168-174, 2004.

SANTOS, A. A., RANZANI-PAIVA, M. J. T., FELIZARDO, N. N., RODRIGUES, E. D. L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 2, p. 141-145, 2004.

SANTOS, D. M. S. **Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de itapecuru mirim, Maranhão**. 2010. 96 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias – Patologia Animal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

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

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SEGATO, L.M., SILVA, C.L. Caracterização do chorume do aterro sanitário de Bauru. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, XXVII, 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000. p. 1-9.

SILVA, M. F. **Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis Niloticus*) expostas ao herbicida 2, 4-D comercial**. 2015. 36 f. Monografia. Graduação em Ecologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

SILVA, P.S. **Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio Criciúma (SC) utilizando como organismos bioindicadores: *Artemia sp.*, *Daphnia magna* e *Allium cepa* L.** 2008. 92 f. Tese (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina. 2008.

SIMONATO, J. D. **Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Prochilodus lineatus***. 2010. 80 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

SISINNO C. L. S., MOREIRA J. C. Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 12 (4): 515-523, out-dez, 1996.

SOTERO-SANTOS, R. B.; ROCHA, O., POVINELLI, J. Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 68, n. 4, p. 628-636, 2007.

STENTIFORD, G. D., LONGSHAW, M., LYONS, B. P., JONES, G., GREEN, M., FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137-159, 2003.

STERZELECKI, F. C. **Como o peixe eurihalino *Bathygobius soporator* lida com as alterações de salinidade ambiental: um estudo morfo-funcional do fígado**. 2006. 41 F. Monografia. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VALENTE, D. COSTA-AMARAL, I. C., DE CARVALHO, L. V. B., DOS SANTOS, M. V. C., DE CASTRO, V. S., RODRIGUES, D. D. R. F., MOREIRA, J. C. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de

postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2017.

VILCHES, M. **Análise genotóxica do rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores**. 2009, 71f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Qualidade Ambiental. Centro universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2006.

VIRGENS, A. C.; CASTRO, R. L.; CRUZ, Z. M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. **Natureza on line**, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

WESTER, P. W., VAN DER VEN, L. T. M., VETHAAK, A. D., GRINWIS, G. C. M., VOS, J. G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 11, n. 3-4, p. 289-295, 2002.

ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, n. 1, p. 63-71, 1998.