



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

THAIS SENA DE TROLLY

AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE EM PEIXES DE DUAS
ÁREAS PORTUÁRIAS DO RIO TAPAJÓS, NO OESTE DO
PARÁ

Santarém-PA
2019

THAIS SENA DE TROLLY

**AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE EM PEIXES DE DUAS
ÁREAS PORTUÁRIAS DO RIO TAPAJÓS, NO OESTE DO
PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do grau de Mestre; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação.

Orientador: Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

**Santarém-PA
2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- T848a Trolly, Thais Sena de
Avaliação de genotoxicidade em peixe de duas áreas portuárias do Rio Tapajós,
no Oeste do Pará./ Thais Sena de Trolly. – Santarém, 2019.
43 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Micronúcleo. 2. Aracatinga. 3. Rio Tapajós. I. Rodrigues, Luís Reginaldo Ribeiro, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 597.098115

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

THAIS SENA DE TROLLY

**AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE EM PEIXES DE DUAS
ÁREAS PORTUÁRIAS DO RIO TAPAJÓS, NO OESTE DO
PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do grau de Mestre; Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação.
Orientador: Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.

Conceito: Aprovada

Data de Aprovação: 26/04/2019



Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Orientador - UFOPA



Dr. Ruy Bessa Lopes
Avaliador - UFOPA



Dr. Marcos Prado Lima
Avaliador - UFOPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que um dia o encontrem, espero que ele possa ajudá-los.

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha família por todo sacrifício e esforço que me permitiu dedicar tanto tempo aos estudos. Aos meus pais em particular por desde sempre colocar os estudos em primeiro lugar.

Aos meus amigos por todo seu apoio e consideração estando presentes nos momentos de maior tensão e consternação. Julie, obrigada por todos os carboidratos e apoio emocional. Bárbara, Vitória e Lídia, obrigada pela compreensão das desculpas que dei durante esses dois anos, vamos nos encontrar mais vezes.

Ao meu orientador por sua paciência, confiança e suporte durante todo o processo teórico, técnico e prático do projeto. Sem todo seu apoio não haveria um trabalho.

A toda a equipe do laboratório por seus conselhos, discussões e ideias que enriqueceram o projeto. Obrigada também pelas conversas nos almoços e intervalos para o café, eles foram uma benção.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado junto ao PPGBio-UFOPA.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da CAPES – Programa Pro-Amazônia (AUXPE 3318/2013), do CNPq por meio do projeto INCT-ADAPTA II, e da UFOPA/PROPPIT por meio do Edital 08/2016.

EPÍGRAFE

Bem-vindo. E parabéns. Estou encantado com seu sucesso. Chegar aqui não foi fácil, eu sei.

Bill Bryson

RESUMO

As áreas portuárias são essenciais para o desenvolvimento socioeconômico da região amazônica, entretanto, podem contribuir para a perturbação dos ecossistemas aquáticos ocasionada pela constante movimentação cargueira e despejo involuntário de contaminantes. Entre os grupos químicos danosos para o meio ambiente e associados com a atividade portuária, inserem-se os metais pesados e derivados de petróleo. Esses xenobióticos podem causar danos genotóxicos a ictiofauna. O presente trabalho teve como objetivo investigar e analisar os possíveis efeitos genotóxicos em *Pimelodus blochii* e *Geophagus proximus* ocasionados pela exposição in situ aos poluentes aquáticos de áreas portuárias nas cidades de Santarém e Itaituba no estado do Pará. Para tanto, coletou-se 60 peixes, *G. proximus* (n=39) e *P. blochii* (n=21), em ambas localidades e utilizou-se os testes de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (ANE) na identificação de perda do material genético e lesões na carioteca e o ensaio cometa na observação de danos ao DNA. Os resultados demonstram um maior Índice de Danos (ID) na área de Itaituba mesmo que este só seja significativo para o *P. blochii*, enquanto o *G. proximus* apresentou a maior frequência de micronucleações e anormalidades nucleares em especial na região de Santarém. Em uma comparação entre as espécies, *G. proximus* destacou-se tanto nas frequências de micronucleações e anormalidades nucleares quanto no Índice de Danos podendo ser considerado mais sensível a exposição a xenobióticos presentes nas áreas estudadas. O aumento recente na movimentação portuária devido a rota hidroviária Tapajós pode estar relacionado a alta frequência de ANE e MN na zona portuária de Santarém, enquanto que a exposição prolongada a resíduos de mineradoras e indústrias na zona de Itaituba seja responsável pelo alto ID na região. Estudos de biomonitoramento e qualidade das águas são recomendados tendo em vista as perspectivas de crescimento deste setor na região oeste paraense.

Palavras chave: micronúcleo, ensaio cometa, acaratinga, mandii, rio Tapajós

ABSTRACT

The port zone are essentials to the socioeconomic development of the Amazon region, however, it can contribute to disturbing aquatic ecosystems by the intensive shipment drive and occasional discharge of pollutants. Among the chemical species that are harmful to the environment and associated with the port activities stand out the heavy metals and petroleum derivatives. Such xenobiotic molecules induce genotoxic damages to aquatic biota. The present study aims to investigate the possible genotoxic effects in fishes *Pimelodus blochii* and *Geophagus proximus* in situ exposed to aquatic pollutants in the port zones of Santarém and Itaituba cities, situated in the Tapajós Rivers, western Pará State. Therefore were collected 60 fishes, *G. proximus* (n=39) and *P. blochii* (n=21) from the both localities. The micronucleus test and counts of erythrocyte nuclear abnormalities were adopted for detection of genetic material losses and nuclear membrane lesions, while the comet assay was applied to evaluate DNA damages. *P. blochii* from the Itaituba port zone showed larger index of damage to DNA, while *G. proximus* from Santarém showed greater frequencies of micronucleus and nuclear abnormalities. A comparison between both species revealed that *G. proximus* is more susceptible to the xenobiotics found in the study area. The last increasing in the port sector in the Tapajós system may be associated with the high level of genotoxic damages observed in fishes from the Santarém area. On the other hand, the prolonged exposition to mining residuals and urban garbage could explain the high level of DNA damage observed in *P. blochii* from the Itaituba area. Biomonitoring and studies of water quality are recommended in view of the projections pointing to the growth of port sector in the western Pará State.

Key words: micronucleus, comet assay, acaratinga, mandii, Tapajós river

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANA	Agência Nacional das guas
ANE	Anormalidades Nucleares
ANTAQ	Associao Nacional de Transporte Aquavirio
BLEB	Blebbled
BN	Binucleate
CDP	Companhia das Docas do Pará
DNA	cido desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
HPA	Hidrocarboneto Policclico Aromtico
ID	ndice de Danos
LOB	Lobed
MN	Micronúcleo
NOT	Notched
OD	Oxignio Dissolvido
VAC	Vacuolated

SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
2 Referencial teórico.....	12
2.1 Uma breve contextualização.....	13
2.2 Xenobióticos no meio aquático.....	14
2.3 Biomarcadores genéticos.....	19
2.3.1. Ensaio Cometa.....	19
2.3.2. Teste de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares.....	21
2.4. Peixes como bioindicadores.....	22
3 Objetivos.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivo Específico.....	24
4 Materiais e Métodos.....	25
4.1 Área de estudo.....	25
4.2 Amostragem.....	26
4.3 Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	26
4.4 Ensaio cometa.....	27
4.5 Análise estatística.....	27
5 Resultados.....	28
5.1 Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares.....	28
5.2 Índices de Danos no DNA.....	32
6 Discussão.....	33
7 Considerações Finais.....	36
8. Referências.....	38

1 Introdução

A implantação do corredor logístico Arco Norte criou uma segunda via de escoamento internacional para os produtos agrícolas (*comodities*) do centro-oeste, principal região produtora de grãos no Brasil. Essa mudança de rota aumentou drasticamente as movimentações do modal hidroviário que ligam o centro-oeste a região amazônica (ANTAQ, 2018). O rio Tapajós é o principal rio de comunicação entre as regiões, originando-se da junção dos rios Teles Pires e Juruena ainda no Mato grosso, possui ampla extensão e profundidade na maior parte de seu trajeto direto até norte do Pará onde desemboca no rio Amazonas sendo ideal para o transporte internacional de mercadorias (ANTAQ, 2018).

Com o crescimento progressivo da movimentação cargueira alterações no percurso hidroviário ocorrem tanto pelas características das cargas movimentadas, quanto pelo aumento de resíduos descartados no meio aquático (SADAUSKAS-HENRIQUE, 2014). Concomitante a isso, outras ações antrópicas como mineração, indústria e agropecuária próximas ao rio despejam altas quantidades de metais e resíduos orgânicos aumentando sua concentração no ecossistema (ANA, 2012).

Os xenobióticos, substâncias instáveis e tóxicas descartadas no meio aquático, agem tanto no ambiente quanto no organismo dependendo de suas características (UCHOA, 2014). Metais por exemplo tendem a agregar no sedimento onde contaminam principalmente organismos bentônicos (MACEDA, 2014; SADAUSKAS-HENRIQUE, 2017). Os combustíveis fósseis invadem o meio aquático principalmente por derramamento de cargas e vazamentos das embarcações, são compostos de frações solúveis como os HPA que se mantêm na superfície dos corpos d'água e frações permanentes mais densas que afundam e se misturam aos sedimentos, ambas são tóxicas e adentram nos organismos expostos (UCHOA, 2014; DISNER, 2017).

Em ambas situações os xenobióticos exigem ciclos de biotransformação complexos e energeticamente dispendiosos para serem metabolizados e excretados, ainda assim após esses ciclos, os resíduos, conhecidos como radicais livres, podem danificar o material genético por serem moléculas leves, capazes de transpassar a carioteca e interagir diretamente com o DNA causando degradação e desnaturação da estrutura em dupla hélice, formação de adutos, formações anormais na estrutura de dupla hélice do DNA onde o material genético agrega a si substâncias químicas reativas, perda de nucleotídeos e quebras cromossômicas (BERRA, 2008; PEDREIRO, 2016; SADAUSKAS-HENRIQUE, 2017).

A matéria orgânica, por sua vez, atua de modo mais sutil, modificando as características físico-químicas da água e elevando a disponibilidade de alimento no meio aquático, aumentando o número de bactérias aeróbicas e reduzindo a oferta de oxigênio principalmente nas regiões sedimentares, causando o estresse oxidativo em animais de maior porte (PASTÓRIO, 2014). Essas lesões ocorrem devido à grande instabilidade e reatividade da molécula tóxica que se liga às proteínas, lipídios e bases nitrogenadas, deformando e quebrando suas ligações prévias o que fragiliza e danifica sua estrutura original (SADAUSKAS-HENRIQUE, 2016). Afim de evitar a replicação da lesão as células dispõem sistemas reparadores capazes de identificar e reparar os danos, no entanto, diante de um alto fluxo de xenobióticos esse sistema é sobrecarregado e o risco de uma lesão ser repassada as células filhas aumenta consideravelmente (BERRA, 2008).

Estes danos e lesões são considerados biomarcadores de efeito e comumente são utilizados em monitoramento de áreas suspeitas de contaminação, sendo considerados de alta precisão e sensibilidade e podem ser observados através de ensaios específicos como o teste de micronúcleo, de alterações nucleares e o ensaio de cometa, cada qual com sua especialidade, e juntos oferecem uma visão holística dos efeitos sofridos pelo ecossistema em estudo (SADAUSKAS-HENRIQUE, 2016).

O ensaio cometa por exemplo é indicado para estudos de toxicologia genética por sua peculiar capacidade de identificar e quantificar o dano as estruturas de reparo do DNA, estando mais voltado ao dano genético que o tecido sofreu e não para se verificar mutações sendo comumente utilizado para testes em dejetos agrícolas, industriais e domésticos (VILCHES, 2009).

O teste de micronúcleo por sua vez tem como seu objeto de estudo corpúsculos com fragmentos cromossômicos ou mesmo cromossomos inteiros completamente separados do núcleo principal, devido essa separação o fragmento de material genético afastado, comumente perde sua funcionalidade (HEDDLE *et al.*, 1983).

Em ambientes aquáticos a ictiofauna se expõe aos xenobióticos diretamente através de seu nicho e nível trófico e indiretamente por sua alimentação, o que os torna úteis como bioindicadores tanto para avaliações de danos em áreas contaminadas quanto para estudos de substâncias potencialmente genotóxicas. As espécies *Pimelodus blochii* e *Geophagus proximus* são espécies comprovadamente sensíveis aos efeitos genotóxicos, ambas apresentam características bentônicas, onívoras sendo consideradas bons bioindicadores. Estas espécies são também comumente encontradas nos rios brasileiros (SANTOS, 2017; SILVA, 2015).

2 Referencial teórico

2.1 Uma breve contextualização

O modal aquaviário tem um papel fundamental no desenvolvimento de uma nação, sendo responsável por 90% da movimentação comercial internacional, é considerado o meio de transporte mais adequado para grandes cargas e distâncias sendo relativamente econômico no uso de combustíveis e demandando poucos cuidados para manutenção (MACHLINE, 2011).

Devido a sua extensa costa e rica rede fluvial, o Brasil está naturalmente estruturado para a movimentação comercial via esse modal. A maior parte da rede fluvial brasileira se encontra na região norte cortando e interligando seus estados e permitindo o acesso as áreas mais profundas e isoladas do país (ANTAQ, 2016). Nesta região o transporte fluvial é visto não apenas como um modal para importação e exportação de produtos, mas como o principal meio de transporte entre as comunidades ribeirinhas, quilombolas e indígenas, sendo por vezes o único meio de conexão entre essas comunidades e os serviços públicos (PINTO, 2011).

Por ser um meio de transporte essencial, diversos portos de pequeno e médio porte são implantados ao longo dos rios, estes têm a função principal de permitir o tráfego de passageiros e pequenas cargas. Há, no entanto, áreas portuárias implantadas e utilizadas especificamente para movimentação cargueira de grande porte como é o caso dos portos de Manaus, Itacoatiara e Tabatinga no estado do Amazonas e os portos de Belém, Itaituba e Santarém no estado do Pará (FILASSI, 2016; BRASIL, 2017). Estes portos se destacam pela constante movimentação cargueira de granéis e derivados de petróleo em diversas formas, desde óleo cru a gás liquefeito, sendo os combustíveis como o óleo diesel e a gasolina os mais presentes (ANTAQ, 2018).

As regiões portuárias são locais altamente antropizados devido as conformações físicas necessárias para sua implantação e manutenção tanto as margens quanto no fundo dos rios (TRISKA, 2015). O derramamento de diversos xenobióticos, também influencia no meio aquático podendo alterar suas características físico-químicas, disponibilidade de alimentos e a ictiofauna local. (PETERSON, 2003; MIRANDA, 2009).

Casos envolvendo a contaminação de ecossistemas por substâncias tóxicas estão sendo documentados em várias partes da região amazônica, como o derramamento de 60 mil litros

de petróleo asfáltico no rio Negro- AM relatado por Sadaukas et al., (2016) e o naufrágio da embarcação Haidar com o derramamento de 700t de óleo bruto no rio Pará, região portuária da Vila do Conde (OLIVEIRA et al., 2017). Apesar dos altos riscos e históricos de acidentes o modal hidroviário na região norte vem sendo cada vez mais utilizado para a movimentação de produtos graneleiros do centro-oeste brasileiro (ANTAQ, 2018).

O sistema Tapajós, um corredor hidroviário parte do superprotejo ‘Arco Norte’ que conecta as regiões produtoras de soja e milho ao exterior através do rio Tapajós, tem apresentado uma movimentação cargueira em expansão, cidades portuárias integrantes desse sistema como Santarém e Itaituba-PA exibiram considerável aumento na movimentação cargueira recente de grãos, combustíveis e metais respectivamente (ANTAQ, 2018).

Esta movimentação expressiva do modal aquaviário em conjunto com outros contaminantes, advindos das atividades industriais, mineradoras e agropecuárias locais, podem alterar as características físico-químicas do meio aquático, bem como expor as populações próximas as áreas portuárias a diversos riscos, inclusive danos ao material genético (LIMA et al., 2015; SOUSA, 2016).

2.2 Xenobióticos no meio aquático

São considerados xenobióticos qualquer substância incomum inserida no ecossistema aquático, essa classificação abrange uma gama de compostos químicos altamente diversa, variando desde metais pesados, petróleo e seus derivados, agrotóxicos, medicamentos a matéria orgânica (MORAIS e AZEVEDO, 2017).

Advindos do descarte inadequado dos dejetos de atividades antrópicas estas substâncias influenciam diretamente o ecossistema aquático, seja alterando as características físico-químicas do ambiente tornando-o até inóspito ou envenenando os organismos expostos, reduzindo sua diversidade, capacidade reprodutiva e imune, lesionando seu material genético e ocasionando mutações que podem ou não ser compatíveis a vida (MELO, 2018; MONTANHA et al., 2011; SZEWCZYK, 2006).

Em regiões portuárias, os xenobióticos presentes estão intimamente relacionados as ações de manejo e manutenção dos portos e suas embarcações, sendo os combustíveis e carga movimentada os principais compostos envolvidos (TAVARES, 2012). No sistema Tapajós, as principais cargas movimentadas estão relacionadas as atividades agropecuárias como grãos e

fertilizantes, seguido de derivados de petróleo como os combustíveis e metais diversos (ANTAQ, 2018).

Outras atividades antrópicas as margens dos rios como mineradoras, industriais, urbanas e agropecuárias também despejam diversos xenobióticos potencialmente tóxicos no meio aquático dentre os quais se destacam metais e frações de combustíveis fósseis, que aumentam a concentração dessas substâncias no meio aquático (MELO, 2018).

2.2.1 Petróleo e seus derivados

Resultado da ação de bactérias em materiais orgânicos como plantas e animais sob as grandes pressões e temperaturas do subsolo, o petróleo e seus derivados são compostos principalmente por hidrocarbonetos parafínicos, naftalenos e aromáticos (FERREIRA, 2014; GALVAN; 2015). Essas substâncias entram em contato com o meio aquático por diversos meios, dentre os quais se destacam os operacionais como a carga, descarga e abastecimento que comumente ocorrem em portos ou terminais e os acidentais tais quais colisões, encalhes e falhas estruturais, bem como por efluentes domésticos e industriais (SZEWCZYK, 2006; SOUZA, 2017).

As consequências desse derramamento variam dependendo das características ambientais como o grau de hidrodinamismo da área, a época do ano e das propriedades particulares da substância tais quais a quantidade, viscosidade, densidade, solubilidade, persistência e ponto de fulgor da substância, essas características permitem a classificação da substância em persistente e não persistente (UCHOA, 2014).

As substâncias classificadas como persistentes são compostas por longas cadeias de hidrocarbonetos o que as torna estáveis, densas, viscosas e de baixa solubilidade podendo sedimentar e durar anos nas profundezas dos corpos d'água (OLIVEIRA, 1998). Estas substâncias, exemplificadas pelos óleos, comumente estão relacionadas aos acidentes em grande escala e causam danos gerais nos ambientes aquáticos relacionados principalmente a permanência de uma mancha na superfície do corpo d'água que impede a incidência dos raios solares e as trocas gasosas causando sufocamento e morte de grande parte da população local (BEZERRA, 2015; SZEWCZYK, 2006).

Os contaminantes não persistentes, sendo compostos principalmente de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) como a gasolina, querosene e nafta, caracterizados por cadeias curtas e instáveis com grande capacidade de volatilização e pouca

permanência no meio aquático e que, no entanto, possuem grande capacidade toxica aos indivíduos expostos a elas, visto que atingem principalmente o macromoléculas celulares dos organismos expostos (UCHOA, 2014).

Apesar da evaporação quase imediata, os HPA são rapidamente absorvidos pelos organismos expostos, em peixes, onde o metabolismo desse xenobiótico é semelhante ao humano, a substância adentra o organismo principalmente pelas brânquias e sistema digestivo onde são transportadas pelo sangue para os órgãos estocando-se no fígado, rins e tecido adiposo e muscular (SADAUKAS-HENRIQUE, 2017). Em momentos críticos como o jejum ou o período de reprodução, onde grandes quantidades de gordura são queimadas o risco de uma intoxicação aumenta exponencialmente devido ao amento do xenobiótico em circulação (BATISTA, 2013).

Diante a exposição crônica a esse xenobiótico os organismos podem apresentar oxidação proteica e peroxidação de lipídeos devido a afinidade da substância a alta atração dos fenóis presentes as macromoléculas celulares como lipídeos, proteínas e, ao seu baixo peso molecular e facilidade na penetração da carioteca, DNA (SADUKAS-HENRIQUE et al., 2017; RODRIGUES, 2014; DEULARNO, 2010).

2.2.2 Metais pesados

Definidos como elementos químicos de alta densidade (superior a 5g/cm^3) ou número atômico maior que 20, os metais dividem-se em três classes: 1) Essenciais, necessários para reações químicas enzimáticas como Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg); 2) Benéficos, que também são importantes para a manutenção orgânica mas em altos níveis são tóxicos como Ferro (Fe) e Cobre (Cu) e 3) Tóxicos, que não apresentam qualquer utilidade para os organismos sendo inclusive danosos a eles como Mercúrio (Hg) e Cádmiu (Cd) (GONÇALVES e PESSOA, 2002; BECKETT, 1991).

A inserção dos metais ao meio aquático comumente está relacionada a atividades mineradoras, industriais e em menor escala urbanas e agropecuárias, cujos resíduos com alta concentração desses elementos são vertidos para os corpos d'água mais próximos onde por suas características próprias de densidade e degradação, os metais comumente se alojam nos sedimentos dos corpos d'água sendo lentamente decompostos, absorvidos e excretados pela biota presente (MELO, 2018).

Na Amazônia, onde o solo é naturalmente rico em metais, ações antrópicas de desmatamento e manutenção e manejo de terras acarreta em um alto risco de contaminação dos recursos hídricos (SOUSA, 2016). Atividades portuárias como a dragagem, onde os sedimentos são revirados e retornam a coluna d'água também são responsáveis por altas concentrações de metais retornarem a coluna d'água (OLIVEIRA et al., 2017).

A alta concentração de metais nos ecossistemas aquáticos é considerada preocupante principalmente devido a sua difícil degradação pelo meio, os microrganismos na base da cadeia trófica são comumente responsáveis pela quebra de substâncias, não conseguem degradar ou eliminar elementos inorgânicos como metais, apesar de alguns terem capacidade seletiva de imobilizar certos elementos através de reações de oxido-redução (MELO, 2018; VALLS e LORENZO, 2002).

Essas reações são essenciais para neutralizar a maior parte dos metais expostos no meio aquático, há, no entanto, situações onde o elemento que sofre ação dos microrganismos se torna mais tóxico que sua forma anterior como ocorre com o mercúrio, um elemento altamente tóxico cujo resultado da biotransformação, o metil Mercúrio (MeHg) é ainda mais perigoso devido sua rápida assimilação pelos organismos expostos (SOUSA 2016).

Além da dificuldade de degradação, os metais também possuem um alto poder acumulativo na biota, sendo armazenados em músculos e tecidos e necessitando de vários ciclos biotransformadores para serem excretados em pequenas frações pelos organismos (LIMA, 2015). A exposição crônica a altas concentrações desses elementos causa diversos danos cujos mais expressivos estão relacionados a redução de biodiversidade e populações, redução da capacidade reprodutiva e imune, lesões no sistema nervoso e no material genético (OLIVEIRA et al., 2017).

2.2.3 Agrotóxicos e fertilizantes

Indispensáveis na agricultura moderna tanto para a contenção e extermínio de pragas (agrotóxicos) quanto para enriquecimento do solo (fertilizantes) ambas classes de xenobióticos, em contato com a hidrosfera, alteram consideravelmente os ecossistemas aquáticos estando relacionados a eutrofização dos recursos hídricos e dispersão de compostos tóxicos (LIMA, 2015).

Os fertilizantes, formados principalmente por nitratos, nitrogênio (N), fosforo (P) e pequenas quantidades de metais favorecem a floração de fitoplâncton que posteriormente se

decompõe por oxidação reduzindo consideravelmente a concentração de oxigênio dissolvido no meio aquático, esse processo, conhecido como eutrofização, ocasiona um risco a vida de peixes e outros organismos aeróbicos (SOUZA et al., 2018).

Como já dito, metais em alta concentração podem ter um efeito negativo e potencialmente tóxico na biota exposta, o mesmo pode ser dito para as concentrações de nitrogênio cujo consumo excessivo está relacionado a indução de metemoglobinemia e formação de nitrosaminas carcinogênicas (OLIVEIRA e SOUZA, 2015).

Quando no meio aquático o nitrato é rapidamente transformado em nitrito, sua forma mais tóxica e absorvido pela biota, no interior de organismos vertebrados, como os peixes essa molécula se agrega ao ferro presente nas hemoglobinas oxidando-o (metemoglobinemia) o que o torna incapaz de transportar oxigênio na corrente sanguínea (RATH e CANAES, 2009). Sob exposição crônica e subletal ao Nitrito peixes apresentam alterações histológicas e degenerativas em órgãos e tecidos como cérebro, brânquias fígado e rins devido as constantes lesões da substância em nível molecular (NASCIMENTO, 2018).

O fosforo, ao contrário do nitrato, não possui ação tóxica, estando relacionado apenas a eutrofização e como limitante de fitoplanctons, por ser um elemento essencial para biota é em sua maior parte absorvido enquanto o sobressalente se agrega aos sedimentos sem maiores impactos ao ecossistema aquático (NASCIMENTO, 2018).

Agrotóxicos por sua vez, são uma gama de substâncias com características de toxicidade, mobilidade e persistência natural diversas, cuja função é prevenir, repelir, inibir ou destruir organismos nocivos a cultura agrícola, classificados quanto seu alvo os agrotóxicos podem ser inseticidas, fungicidas, nematicidas e herbicidas dentre os quais se destacam o glifosato e a atrazina (MELO, 2018; SANTOS et al., 2018).

Por se tratarem de herbicidas e atuarem diretamente na fotossíntese (atrazina) ou na produção de aminoácidos aromáticos em plantas (glifosato) acreditava-se não haver influência em animais, suposição descartada por diversos ensaios experimentais e de biomonitoramento onde percebeu-se alterações comportamentais, fisiológicas e histopatológicas em diferentes espécies de peixes como o comportamento errático, aumento da produção de muco e de movimentos operculares bem como de processos enzimáticos indicativos de estresse oxidativo (NWANI et al., 2010; VENTURA et al., 2007).

Posteriormente foram realizados estudos citotóxicos onde notou-se o aumento proporcional da frequência de lesões a carioteca e perda de material genético a concentração das substâncias tóxicas, comprovaram seus efeitos danosos aos organismos em especial no ecossistema aquático onde podem alcançar longas distâncias de sua fonte de origem (TUREK et al., 2017; RAMSDORD et al., 2012; DISNER et al., 2011). Essas alterações percebidas foram consideradas biomarcadores e são utilizadas constantemente no meio científico para avaliar o potencial tóxico de diversas substâncias.

2.3 Biomarcadores genéticos

São considerados biomarcadores, variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que possam ser avaliadas através de tecidos, fluidos ou ações de um organismo mediante exposição a um contaminante (CHOUERI, 2015). Estudos ecotoxicológicos fazem uso de variados biomarcadores e técnicas para avaliar os efeitos de diversos contaminantes no ambiente, dentre estes se destacam os biomarcadores genéticos por apresentarem o potencial dano genotóxico (KRAWCZYK, 2016).

Essa categoria de danos é particularmente interessante devido a capacidade dos xenobióticos causarem mutações cujos efeitos podem ser hereditários, teratogênicos e/ou cancerígenos afetando expressivamente a população e diversidade da biota exposta (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998).

Compostos como o radical superóxido, resultado do metabolismo, o fenol e outras moléculas de pequeno peso são capazes de trespassar a carioteca e interagir diretamente com o DNA o que causa a degradação e desnaturação da dupla hélice além da formação de adutos e micronúcleos, estas mesmas moléculas são igualmente danosas a membrana por serem afins de lipídios e podem causar sua dismorfia (BERRA, 2008).

Essas lesões ao DNA e sua membrana protetora ocorrem devido à grande instabilidade e reatividade da molécula tóxica que, em busca de estabilidade, liga-se as proteínas, lipídios e bases nitrogenadas deformando e quebrando suas ligações prévias o que fragiliza e danifica sua estrutura original (VIEIRA, 2011). Estes danos são considerados biomarcadores de efeito e comumente são utilizados em monitoramento de áreas suspeitas de contaminação sendo considerados de alta precisão e sensibilidade e podem ser observados através de ensaios específicos como o teste de micronúcleo, de alterações nucleares e o ensaio de cometa, cada

qual com sua especialidade e, quando juntos, oferecem uma visão holística dos efeitos sofridos pelo ecossistema em estudo (SADAUKAS-HENRIQUE, 2014).

2.3.1. Ensaio Cometa

O ensaio de cometa, ou eletroforese em gel (Single Cell Electrophoresis) é indicado para estudos de toxicologia genética por sua peculiar capacidade de identificar e quantificar o dano as estruturas de reparo do DNA, estando mais voltado ao dano genético que o tecido sofreu e não para se verificar mutações como os demais comumente utilizado para testes em efluentes agrícolas, industriais e domésticos.

Dentre suas principais vantagens destacam-se sua simplicidade, rápida performance e sensibilidade a vários tipos de danos de DNA, além de permitir a mensuração de danos em células individuais, utilizar um baixo número de qualquer célula eucariota em seus testes (LEE e STEINERT, 2003; BUCKER *et al.*, 2006).

Este teste utiliza-se da eletroforese para identificar a lesão nuclear baseando-se no nível de compactação do núcleo, quando o mesmo se encontra lesionado as histonas que mantém as bases nitrogenadas agregadas se enternecem liberando o material genético e formando uma “cauda” semelhante à de um cometa. Quanto maior a cauda, maior a liberação de material genético e, portanto, maior o dano nuclear recebido (VILCHES, 2009).

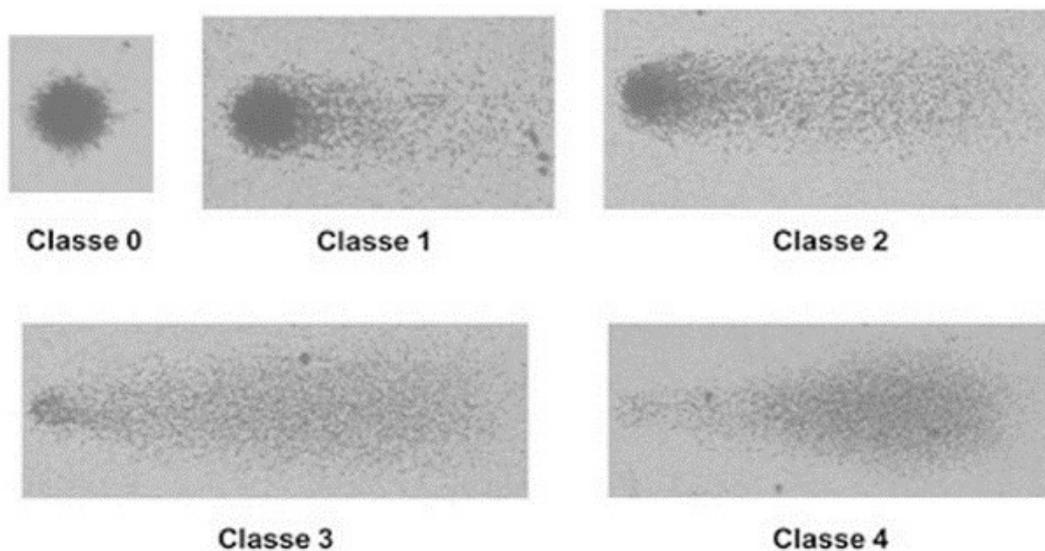


Figura 1: Classificação de dano ao DNA por cometa; Fonte: VILCHES, 2009.

Como observado na Figura 1 a mensuração do dano sofrido pelo DNA pode ser feita através do comprimento da cauda, a concentração do material genético na cauda e pela porcentagem de células com diferentes classes de danos (TICE, 1995). Ao longo do tempo, diversos trabalhos veem utilizando essa técnica tanto no campo como um bioindicador quanto em laboratório para mensuração de competência e concentração danosa de substâncias.

2.3.2. Teste de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares

O teste de micronúcleo por sua vez tem como seu objeto de estudo corpúsculos com fragmentos cromossômicos ou mesmo cromossomos inteiros completamente separados do núcleo principal, devido essa separação o fragmento de material genético afastado comumente perde sua funcionalidade (HEDDLE et al., 1983; ROTH et al., 2002).

A formação do micronúcleo ocorre durante a divisão mitótica, no período da anáfase, como consequência do mau funcionamento do centrômero que não se agrega ao cromossomo e o afasta dos demais, as repercussões desse afastamento variam de acordo com o fragmento genético disperso podendo não apresentar qualquer efeito negativo, ausência ou excesso de produção de uma proteína, apoptose e descontrole da multiplicação celular (FENECH, 2000 *apud* ARALDI et al., 2013).

Normalmente, o organismo tem capacidade de identificar e eliminar células que apresentam MN e comprometem o bom funcionamento do tecido, no entanto, devido a exposição ao agente genotóxico, o excesso de células micronucleadas sobrepõem-se a capacidade de auto reparo do espécime permitindo que suas consequências repercutam em todo o corpo do animal ou vegetal (KERNE, 2006).

Hoofman e Raat (1982) foram os responsáveis por adaptarem o teste as células de peixes abrindo um leque de possibilidades de seu uso em diversas substâncias potencialmente mutagênicas encontradas nos ambientes aquáticos. Durante os estudos de células micronucleadas, os pesquisadores notaram a existência de anormalidades nucleares e as relacionaram aos processos de morte celular, mutagenicidade e genotoxicidade.

Vilches (2009) observou e categorizou diversas ANE em eritrócitos de *Astyanax jacuhiensis*, como *blebbed*, *lobed* e *notched*, uma pequena invaginação da membrana e da

cromatina, uma invaginação maior formando lóbulos e profundas invaginações ou mesmo lacunas onde a cromatina está ausente respectivamente, além de micronúcleos e brotos nucleares, considerados o resultado do procedimento de expulsão do MN do núcleo principal (CARRASCO et al. 1990; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002; VILCHES, 2009).

Migliore et al. (2014) enfatiza que, predominantemente, utiliza-se o teste de micronúcleo em culturas de células linfáticas expostas a substâncias potencialmente tóxicas, esse mesmo teste quando associado a hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) ainda é capaz de evidenciar a localização original dos fragmentos cromossômicos micronucleados e diferenciar sua formação em atividades clastogênicas (aberrações estruturais) e aneuplogênicas (alterações numéricas) como observado na Figura 2 abaixo.

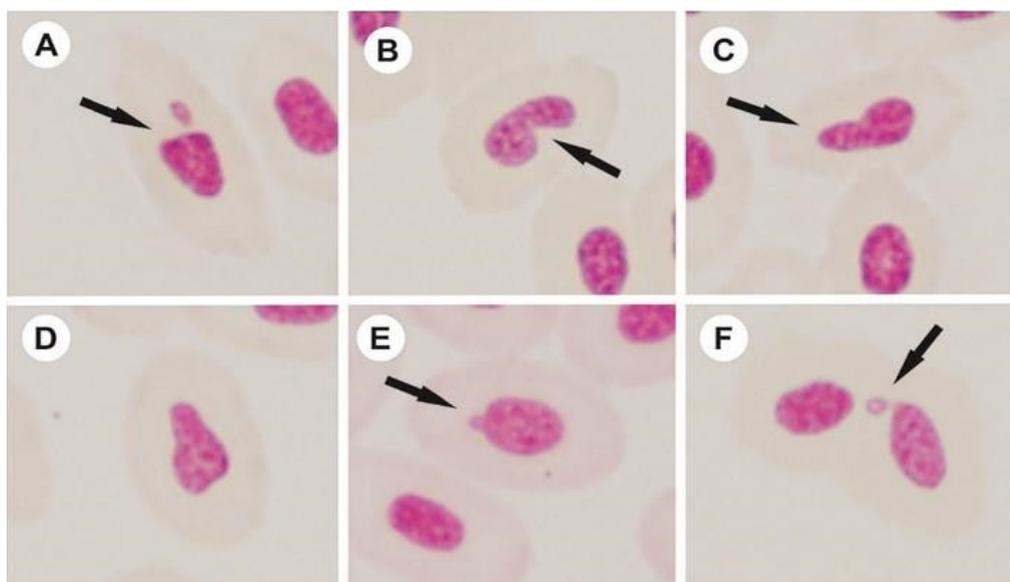


Figura 2: tabela de identificação de anormalidades nucleares; A) micronúcleo; B) notched; C) blebbed; D) lobed; E) broto nuclear; F) *broken-egg*. Fonte: CORREA, 2017.

Tanto o ensaio de cometa quanto o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares são importantes ferramentas para a identificação e classificação de toxicidade das diversas substâncias presentes no ambiente permitindo ações preventivas as comunidades expostas antes da apresentação morfológica das mutações.

2.4. Peixes como bioindicadores

São considerados bioindicadores, organismos sentinelas pelo qual se permite avaliar a integridade e saúde dos ecossistemas em que se encontram, atuando como indicadores biológicos para perturbações de atividades antrópicas com potencial antrópico (LIMA, 2015). Para tanto é ideal que os organismos sejam nativos e abundantes da área estudada, resilientes e com capacidade de se ambientar a condições experimentais, inclusive a ambientes sem a presença do contaminante analisado (KLINGELFUS, 2013).

Peixes tem se destacado como bioindicadores para ecossistemas aquáticos devido sua presença em todos os níveis tróficos, alta mobilidade, rápida reprodução, simples manutenção, fisiologia descrita, além de possuir importância socioeconômica e fisiologia semelhante a humana permitindo inferir a saúde de populações humanas a partir de seu estudo (ARIAS et al.,2007). Estudos com *Geophagus spp.* e *Pimelodus blochii* tem demonstrado sua sensibilidade a diversos xenobióticos, com fisiologia descrita e reconhecida resiliência estes se destacam como bioindicadores (FREITAS e SIQUEIRA-SOUZA, 2009).

Pimelodus blochii é um peixe de características bentopelágicas de hábitos crepusculares facilmente encontrado nas bacias hidrográficas brasileiras (SOARES et al., 2006). Popularmente conhecido como mandii é um alimento comum para populações ribeirinhas amazônicas apesar de não ter peso econômico na região, o que o torna um indicador adequado para avaliação da contaminação dessas comunidades (PRADO, 2005).

Geophagus spp. por sua vez também apresenta características bentopelágicas com hábitos diurnos com ampla distribuição nas bacias brasileiras (YAMAMOTO, 2016). Altamente requisitado no mercado de aquarofilia por suas cores vivas e atrativas, apresenta uma alta resiliência e capacidade adaptativa além da sensibilidade a presença de xenobióticos, se mostra, portanto, como um indicador adequado para estudos de genotoxicidade (ROCHA, 2015).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o perfil genotóxico de duas espécies de peixes nativos das áreas portuárias de Itaituba e Santarém, Pará.

3.2 Objetivo Específico

- Quantificar a frequência de anormalidades nucleares e micronúcleos nas espécies *Pimelodus blochii* e *Geophagus proximus* provenientes das áreas portuárias de Itaituba e Santarém, Pará;
- Descrever os danos genotóxicos observados nas espécies estudadas *Pimelodus blochii* e *Geophagus proximus*;

4 Materiais e Métodos

4.1 Área de estudo

As áreas portuárias de Itaituba e Santarém localizam-se às margens do rio Tapajós, Pará/Brasil. O porto de Santarém, à margem direita, está próximo a confluência com o rio Amazonas, conhecido por Ponta da Caieira ($02^{\circ} 25' S$; $54^{\circ} 43' W$) enquanto que Itaituba, à margem esquerda se encontra na cidade de mesmo nome cujo território faz limite a direita com os municípios Aveiro, Altamira, Novo Progresso, Rurópolis, Trairão e Jacareacanga e a esquerda com o estado do Amazonas ($04^{\circ} 16' 34'' S$; $55^{\circ} 59' 01''$).

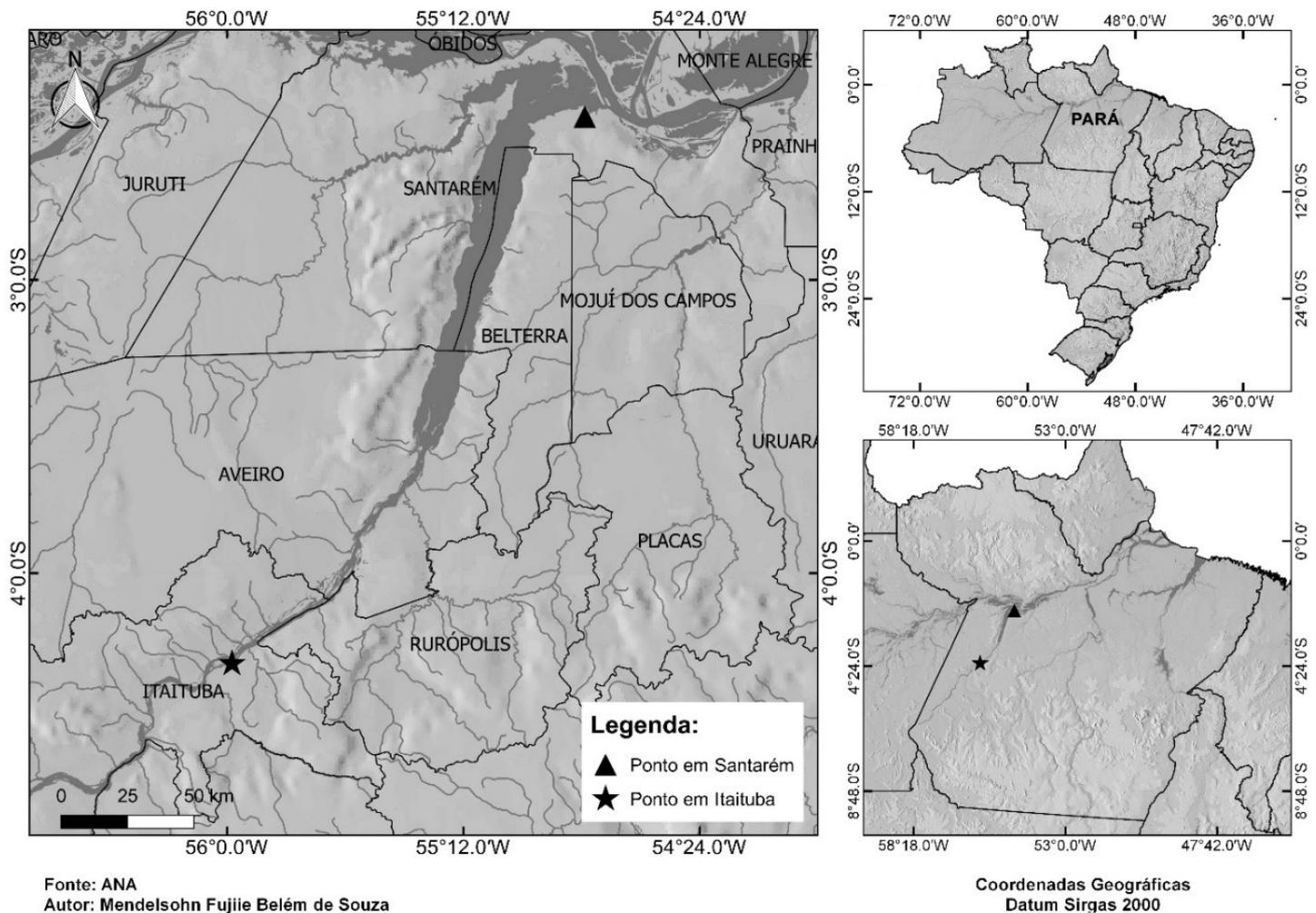


Figura 3: Áreas de coleta destacadas em mapa.

4.2 Amostragem

Foram coletados 60 peixes, sendo *Geophagus proximus* (n=39) e *Pimelodus blochii* (n=21). Dados biométricos dos peixes são apresentados na Tabela 1. Os peixes foram capturados por pescadores locais utilizando redes de arrasto. Após a coleta os animais foram mantidos em caixas plásticas de 50L com água do local da coleta, o ambiente de recepção dos peixes capturados foi areado mecanicamente por mini compressores de aquário. No mesmo dia da coleta foram obtidas amostras de sangue para a confecção de esfregaços, para análise de micronúcleos ANE, e espalhamentos em lâminas pré cobertas com agarose para ensaio cometa.

Tabela 1: Dados biométricos (Peso, Comprimento Padrão) de peixes coletados nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba, PA.

Espécie	Localidade	n	CP (cm)	Peso (g)
<i>Geophagus proximus</i>	Rio Tapajós, Santarém-PA	16	17.92±1.92	101.19±28.62
	Rio Tapajós, Itaituba-PA	23	8.8±1.8	18.8±11.3
<i>Pimelodus blochii</i>	Rio Tapajós, Santarém-PA	12	-	-
	Rio Tapajós, Itaituba-PA	9	14.01±0.90	46.33±7.73

4.3 Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares

De cada animal foi coletado aproximadamente 50µl de sangue através de punção da veia caudal ou da região branquial, utilizando-se seringa previamente heparinizada, posteriormente diluída em meio RPMI. As distensões sanguíneas em duplicata foram postas para secar a temperatura ambiente por uma noite e fixadas em metanol P.A. por 10 minutos, coradas com Giemsa 5% e diluídas em tampão fosfato pH 6.8, por 8 minutos sendo posteriormente lavadas com água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente. A análise citológica foi processada em microscópio óptico sob magnificação 1000x. Foram avaliados 1000 eritrócitos por lâmina e a identificação de micronúcleos e ANE seguiu os critérios definidos por Fenech (2000), Vilches (2009) respectivamente. O cálculo da frequência de micronucleações e Anormalidades Nucleares se dá através da seguinte fórmula:

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

4.4 Ensaio cometa

Para a análise de lesões do DNA seguiu-se o protocolo descrito por Silva (2007) com adaptações e coloração com nitrato de prata de acordo com Santos (2009). A amostra sanguínea foi diluída com meio RPMI e misturada com 75µl de agarose low melting. Essa mistura foi espalhada em lâminas pré cobertas por uma camada de agarose normal melting e montadas com lamínulas (24x60mm). As lâminas montadas foram deixadas no refrigerador por 1h para solidificar, e então as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas em solução de lise gelada (2.5 M NaCl, 100 mM Tris, pH 10.0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e deixadas no refrigerador por 24h. Esses procedimentos ocorreram sob baixa iluminação com as luzes do laboratório desligadas. Após a lise, as lâminas foram dispostas em cuba horizontal de eletroforese e cobertas com tampão de eletroforese (Solução A= 300mM NaOH, Solução B = 1 mM EDTA) deixadas por 20 minutos sob refrigeração. Em seguida, iniciou-se a eletroforese a 25V, 300mA por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas em tampão Tris (0.4 M Tris pH 7.5) por 5 minutos (3x) e lavadas com H₂O destilada gelada. Depois de secas, foram fixadas com solução fixadora (15% de ácido tricloroacético + 5% de sulfato de zinco + 5% de glicerol) por 10 minutos e lavadas com H₂O destilada gelada (3x). As lâminas foram secas em estufa a 37°C por uma hora e meia e coradas com solução de nitrato de prata (solução A= 5% de carbonato de sódio e solução B= 0.1% de nitrato de amônia com 0.1% de nitrato de prata, 0.25% de ácido tungstosilícico e 0.15% de formaldeído) até a solução escurecer, seguida de lavagem com água destilada (3x). Foram analisadas 100 células por indivíduo e a visualização/scoring das classes de danos se processou em microscópio óptico sob magnificação de 200x. O índice de danos (ID) foi calculado pelo número de cometas em cada classe multiplicado pelo valor da classe (AZQUETA e COLLINS, 2014) como apresentado na fórmula a seguir:

$$ID=(0 \times n0)+(1 \times n1)+(2 \times n2)+(3 \times n3)+(4 \times n4)$$

4.5 Análise estatística

As medidas (contagem e frequência), assim como o ID do ensaio cometa foram organizadas em planilhas com auxílio do programa Microsoft Excel. Para testar a hipótese de não haver variação significativa entre as espécies e entre os sítios amostrais os dados foram pareados e submetidos ao teste Mann-Whitney (U), por se ajustar a amostras de tamanhos diferentes e de distribuição não normal. O nível de decisão alfa foi pré-estabelecido em $p=0.05$. As análises foram executadas com auxílio do programa BioEstat 5.3 (Ayres, et al.; 2007).

5 Resultados

5.1 Frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares

Foram analisados 60 peixes de duas espécies (*G. proximus* e *P. blochii*) provenientes do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA. Para análise de micronúcleos foram observados o total de 120 mil eritrócitos que revelaram a frequência de 96 células micronucleadas (Tabela 2). A frequência de micronúcleos variou significativamente entre as amostras das duas localidades, sendo que *G. proximus* apresentou maior frequência na área portuária de Santarém, enquanto que, em *P. blochii* as micronucleações foram mais frequentes na área portuária de Itaituba (Figuras 4, 5). Comparando-se as duas espécies entre si, com as amostras das duas localidades, não se observou variação na frequência de micronúcleos ($U=366.5$; $p=0.505$).

Tabela 2: Frequência de micronúcleos em eritrócitos de duas espécies de peixes do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA. Micronúcleos (MN), Erro Padrão (EP).

Espécie	Localidade (n amostral)	M N	%MN	EP	Mediana	Total de células analisadas (x1000)
<i>Geophagus proximus</i>	Santarém (16)	47	0.147	0.034	0.125	32
	Itaituba (23)	12	0.026	0.015	0.000	46
<i>Pimelodus blochii</i>	Santarém (12)	10	0.042	0.022	0.000	24
	Itaituba (9)	27	0.150	0.037	0.150	18

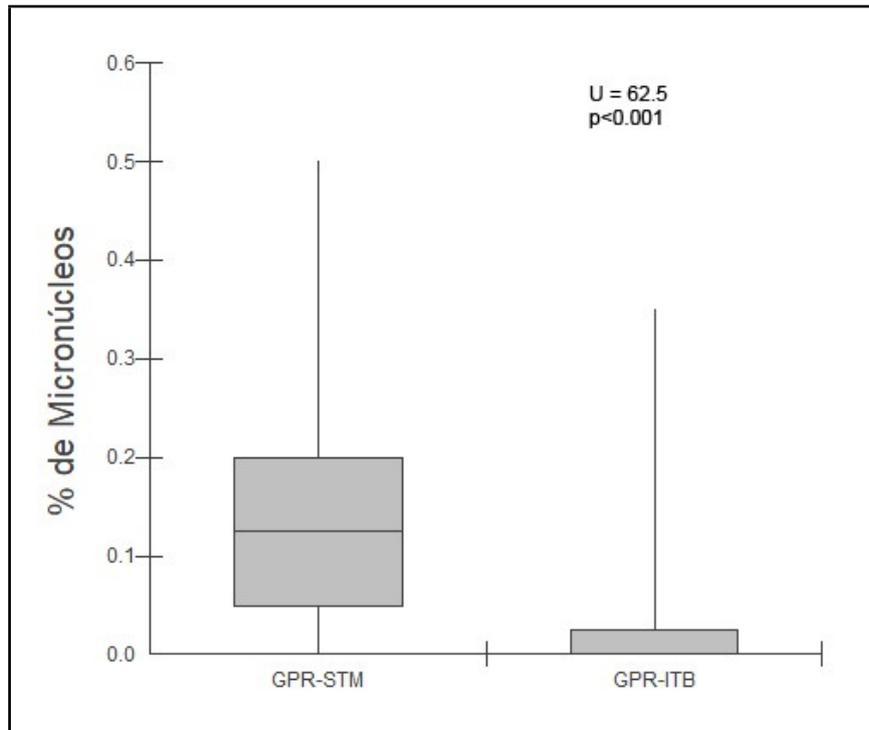


Figura 4: Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Geophagus proximus* do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém (GPR-STM) e Itaituba (GPR-ITB).

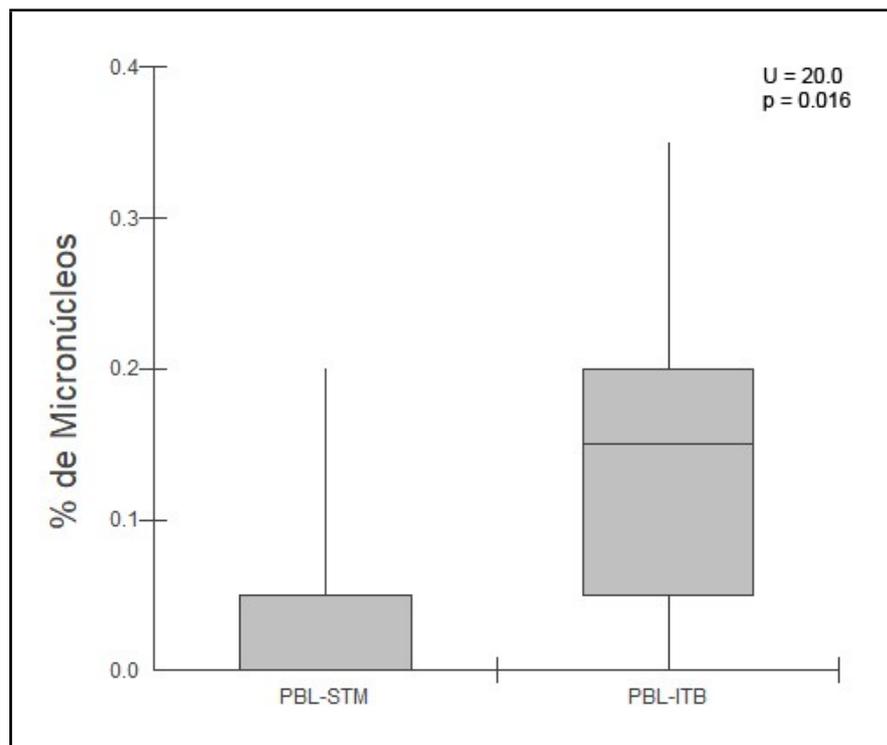


Figura 5: Frequência de micronúcleos em eritrócitos de *Pimelodus blochii* do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém (PBL-STM) e Itaituba (PBL-ITB).

Foram observadas 437 ANE em 120 mil eritrócitos lidos, sendo que *G. proximus* coletados em Santarém apresentaram a maior frequência com cerca de 11 a 15 x acima do que foi observado nas outras amostras (Tabela 3). A categoria Lobed (174) foi a mais frequente, seguida por Blebbed (138), enquanto que Binucleate (23) foi a mais rara (Tabela 3, Figura 6). Tal como observado com o biomarcador MN, a frequência de ANE foi significativamente maior em *G. proximus* da área portuária de Santarém, $p < 0.0001$ (Figura 7). Por outro lado, as amostras de *P. blochii* não mostraram variação entre as áreas portuárias de Santarém e Itaituba ($U=45.0$; $p=0.52$). Comparando-se as duas espécies entre si, observamos que *G. proximus* apresentou um aumento significativo na frequência de ANE, $p=0.006$ (Figura 8).

Tabela 3: Frequência de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE) de duas espécies de peixes do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA. Binucleate (BN), Blebbed (BLEB), Lobed (LOB), Notched (NOT), Vacuolated (VAC).

Espécie	Localidade (n amostral)	BN	BLEB	LOB	NOT	VAC	ANE TOTAL	Células analisadas (x1000)	%AN E
<i>Geophagus proximus</i>	Santarém (16)	12	106	154	63	18	353	32	1.10
	Itaituba (23)	5	23	7	9	4	48	46	0.10
<i>Pimelodus blochii</i>	Santarém (12)	2	5	12	2	3	24	24	0.10
	Itaituba (9)	4	4	1	2	1	12	18	0.07
Total		23	138	174	76	26	437	120	

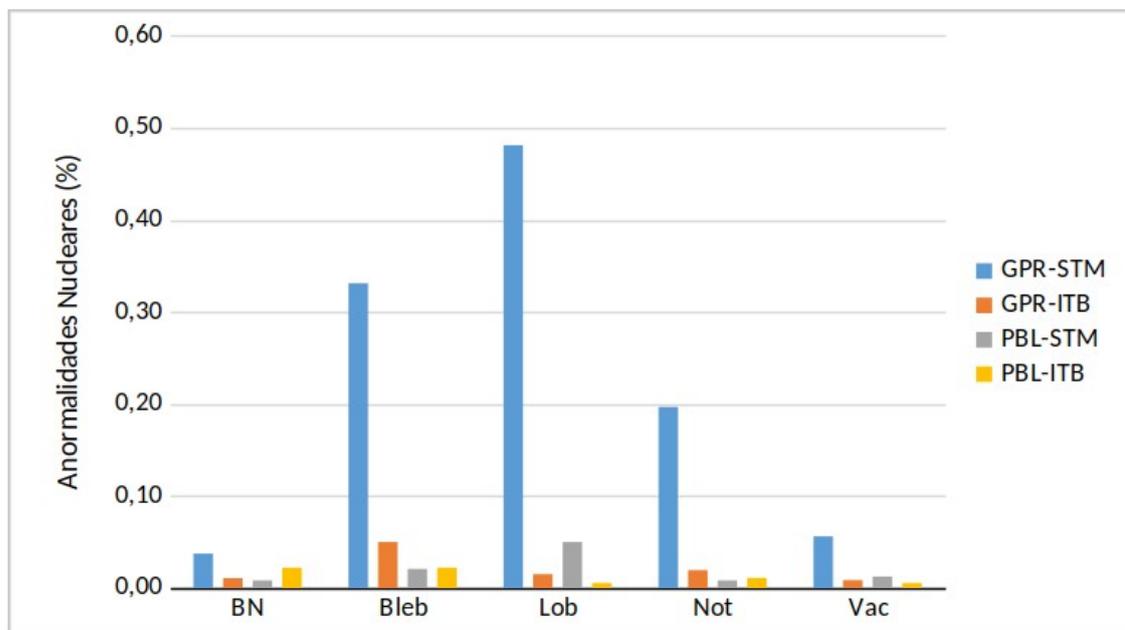


Figura 6: Distribuição das frequências relativas de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE) de duas espécies de peixes do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA. Binucleate (BN), Blebbed (BLEB), Lobed (LOB), Notched (NOT), Vacuolated (VAC), *Geophagus proximus* (GPR), *Pimelodus blochii* (PBL), Santarém (STM), Itaituba (ITB).

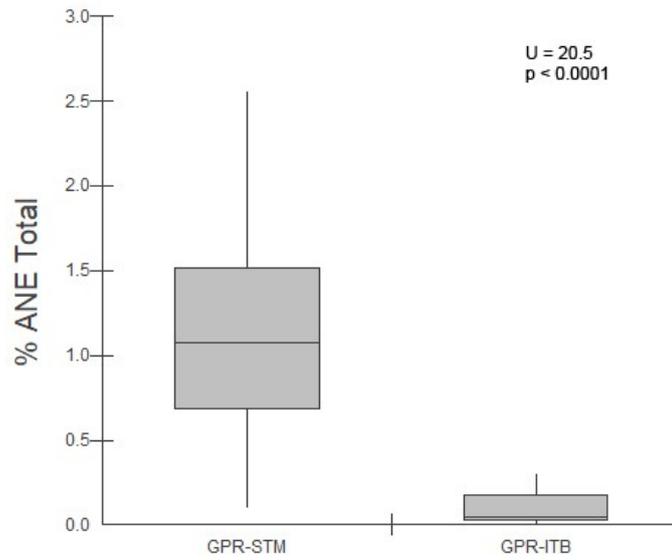


Figura 7: Frequência de Anormalidade Nucleares Eritrocitárias (ANE) em *Geophagus proximus* do rio Tapajós, nas áreas portuárias de Santarém (GPR-STM) e Itaituba (GPR-ITB).

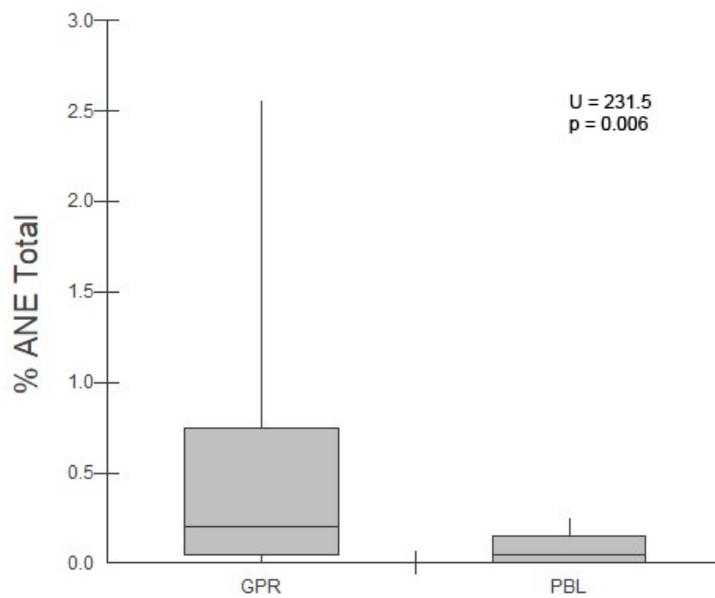


Figura 8: Frequência de Anormalidade Nucleares Eritrocitárias (ANE) entre *Geophagus proximus* (GPR) e *Pimelodus blochii* (PBL) do rio Tapajós, coletados nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA.

5.2 Índices de Danos no DNA

Nesta análise a amostra de *G. proximus* de Santarém foi reduzida para nove indivíduos, devido à perda de material durante o processamento da técnica. Quanto ao índice de danos revelado por escore visual ensaio cometa, observou-se que os valores médios foram mais elevados em *G. proximus*, porém ambas as amostras de *G. proximus* não apresentam variação significativa ($U=100$; $p=0.75$). O índice de danos no DNA de *P. blochii* foi significativamente maior na amostra de Itaituba ($U=8.5$; $p=0.0012$), Figura 9. Quando comparamos as duas espécies entre si, observou-se uma variação significativa ($U=212$; $p=0.017$) sendo o ID mais elevado na espécie *G. proximus* (Figura 10).

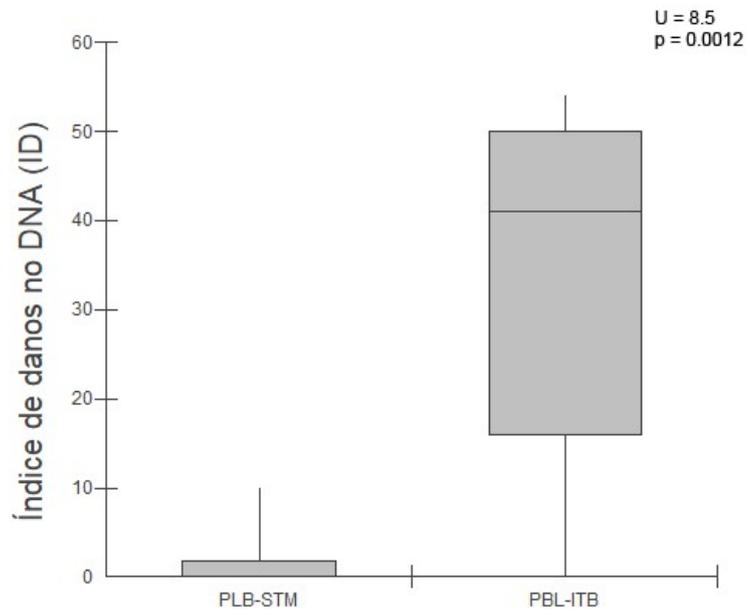


Figura 9: Índice de Danos no DNA (ID) revelados por Ensaio Cometa em eritrócitos de *Pimelodus blochii* (PBL) do rio Tapajós, coletados nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA

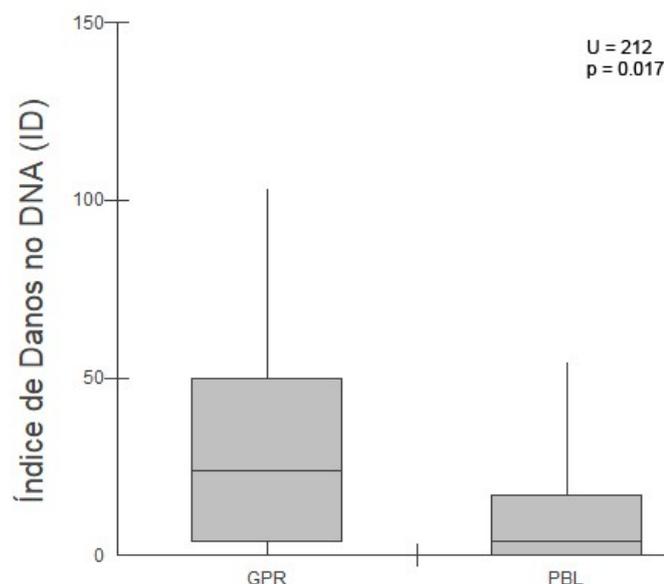


Figura 10: Índice de Danos no DNA (ID) revelados por Ensaio Cometa em eritrócitos de *Geophagus proximus* (GPR) e *Pimelodus blochii* (PBL) do rio Tapajós, coletados nas áreas portuárias de Santarém e Itaituba-PA.

6 Discussão

A movimentação graneleira no rio Tapajós tem apresentado um aumento progressivo desde a implementação do corredor multimodal ‘Arco Norte’. Em 2018, essa movimentação apresentou acréscimo considerável das cargas de fertilizantes e grãos no porto de Santarém, colocando-o entre os 10 principais portos organizados em movimentação no Brasil (ANTAQ, 2018). Os portos, por serem áreas de grande movimentação de embarcações e cargas, são considerados empreendimentos que agregam riscos potenciais de contaminação e degradação do ambiente aquático (SOARES-GOMES, 2010; TRISKA, 2015). Por exemplo, o rio Pará na zona portuária de Vila do Conde (Barcarena-PA), encontra-se impactado por hidrocarbonetos derivados de petróleo e metais pesados (OLIVEIRA et al. 2017), tais poluentes podem ser absorvidos pelos organismos aquáticos através das brânquias, ingestão da água ou de alimentos contaminados (BÍCEGO et al. 2008).

Das duas espécies do rio Tapajós avaliadas no presente estudo, *Geophagus proximus* apresentou os maiores índices de danos genotóxicos. As frequências de MN e ANE, nesta espécie, foram significativamente maiores na zona portuária de Santarém. Vários autores tem demonstrado a susceptibilidade de *Geophagus* spp. aos efeitos genotóxicos (e.g. aumento na frequência de micronúcleos, índice de danos no DNA) e danos teciduais em brânquias e

fígado quando expostos a poluição aquática por metais pesados (DORIA 2017; LOPEZ et al. 2016; SANTOS, 2018; GOMES et al. 2019) e também por derivados de petróleo (HPA) (OSÓRIO et al. 2013). Nas águas da zona portuária de Santarém já foi detectada a presença de HPA que foram associados com operações de tancagem e pequenos derramamentos de óleo combustível (SEP/PR, 2014). Metais pesados, também considerados potencialmente genotóxicos, foram encontrados em baixa concentração, a exceção do ferro e alumínio que ficaram acima do limite determinado pela legislação CONAMA para rios de classe II (MIRANDA et al. 2009).

É importante destacar que as informações técnicas disponíveis sobre a situação ambiental da zona portuária de Santarém são incipientes, compiladas em grande parte do Relatório de Impacto Ambiental (RIMA) da Cargill (CDP, 2017). Até onde sabemos, o estudo de Miranda et al. (2009) é a única publicação científica que reporta sobre a qualidade da água e presença de metais pesados no rio Tapajós, zona urbana de Santarém incluindo a área do porto. Devido a carência de informações é inadequado especular sobre uma possível associação entre o alto índice de danos genotóxicos observados em *G. proximus* da zona portuária de Santarém (presente estudo) e a poluição hídrica nesta localidade. Por outro lado, tal hipótese não pode ser descartada.

Em contraste, *Pimelodus blochii* mostrou maiores índices genotóxicos (MN e ID-DNA) na zona portuária de Itaituba. Peixes do gênero *Pimelodus* já foram utilizados em estudos de biomonitoramento em corpos d'água e mostraram aumento da frequência de micronúcleos quando expostos à águas poluídas do rio Paranaíba (SILVA e NEPOMUCENO, 2010). Tal como observado para a zona portuária de Santarém há grande deficiência de dados ambientais sobre a zona portuária de Itaituba. A porção do rio Tapajós a montante da cidade de Itaituba é amplamente conhecida como uma importante província mineral, com intensa atividade de garimpo de ouro nas últimas quatro décadas, sendo responsável pelo lançamento de enormes volumes de mercúrio na bacia do rio Tapajós (NEVADO et al. 2010). Na região de Itaituba, muitos estudos evidenciam a exposição humana e contaminação do pescado por metilmercúrio (PINHEIRO et al. 2000; SANTOS et al. 2000; VIEIRA et al. 2011; CRESPO-LOPEZ, 2011). É razoável admitir que *P. blochii* da região de Itaituba pode estar exposto à contaminação por metilmercúrio. O efeito genotóxico dos compostos de mercúrio sobre eritrócitos de peixes é variável, podendo induzir aumento de MN (PERRY et al. 1988), aumento de ANE (ROCHA et al 2011), ou sem efeito aparente (AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000). Essa variabilidade pode ser devido a sensibilidade diferencial dos

organismos aquáticos e de suas relações com o próprio ecossistema aquático (GRISÓLIA et al. 2009).

O crescimento do Setor Portuário é considerado uma questão estratégica na agenda governamental para o crescimento econômico do Brasil. O corredor hidroviário do Tapajós conecta as grandes áreas produtoras de soja do centro oeste com a bacia do rio Amazonas. Os estudos de projeção da Companhia Docas do Pará estimam um crescimento da atividade portuária na região do Tapajós em pelo menos 2.9% até 2023. Presume-se que os impactos sobre o ambiente aquático tendem a acompanhar o crescimento deste setor econômico e podem ser potencializados por fatores como: crescimento urbano desordenado, aumento dos índices de desflorestamento, atividade mineradora e mudanças climáticas. Com exceção de estudos sobre exposição ao mercúrio, encontra-se uma enorme deficiência de dados ambientais sobre poluição do rio Tapajós e quase total ausência de informações sobre o efeito de poluentes na biota aquática. No presente estudo, analisamos danos genotóxicos em *P. blochii* (mandií) e *G. proximus* (acaratinga), espécies comuns da fauna do rio Tapajós e que são itens importantes da dieta de comunidades ribeirinhas locais. Os resultados sugerem que essas espécies podem estar expostas a diferentes classes de poluentes. Entretanto, estudos futuros poderão elucidar as possíveis associações entre os efeitos genotóxicos observados e os níveis de poluição do rio Tapajós. Ambas as espécies se mostraram eficientes para uso como espécies sentinela, assim como, recomenda-se a adoção de testes de genotoxicidade em futuros programas de biomonitoramento no rio Tapajós.

7 Considerações Finais

O rio Tapajós está exposto a diversos xenobióticos ao longo do seu trajeto no estado do Pará, as áreas portuárias e as encostas de cidades comumente atuam como pontos de descarga de resíduos industriais, urbanos e de combustíveis fósseis sem tratamentos em suas águas. Outras regiões, próximas a áreas mineradoras e extrativistas acrescentam metais pesados aos efluentes tornando-o mais tóxico ao meio aquático.

Diversos estudos já foram realizados em regiões mineradoras devido ao seu alto potencial genotóxico e danoso aos organismos aquáticos e as comunidades humanas próximas, no entanto o monitoramento de áreas portuárias se dá principalmente pela companhia das docas e empresas particulares cujos estudos se limitam a análises físico-químicas periódicas sem investigações aprofundadas quanto aos impactos no ecossistema em questão.

Diante de tal cenário este estudo se propôs a investigar os danos genotóxicos de duas espécies písceas encontradas no rio Tapajós, nas áreas portuárias de Itaituba e Santarém, tendo quantificado a frequência de micronucleações (MN) e anormalidades nucleares (ANE) bem como o índice de danos (ID) através do teste de micronúcleo e ensaio cometa respectivamente em ambas localidades e espécies.

Entre os grupos estudados o *Geophagus proximus* da área portuária de Santarém apresentou a maior frequência de micronucleações e anormalidades nucleares apesar do índice de danos não ter sido significativo entre as localidades para a espécie. O *Pimelodus blochii* por sua vez não se destacou nos testes de MN e ANE, mas exibiu uma diferença considerável entre os grupos de Santarém e Itaituba onde o último também apresentou o maior ID.

O rápido aumento da movimentação cargueira no sistema Tapajós implantado pelo arco norte é recente, tendo sido observado claramente nos anos de 2017 e 2018 e, portanto, ainda não apresenta dados concretos sobre seus efeitos as cidades portuárias que o sustentam, concomitante a isso a falta de investigações precedentes destas mesmas cidades torna difícil a identificação das consequências a qualidade da água e a ictiofauna local.

Pode-se supor, no entanto, através de registros anteriores sobre a influência antrópica e acidentes portuários ou envolvendo embarcações, que o efeito genotóxico está presente e é considerável sendo o responsável por danos irreversíveis ao ecossistema aquático e o transpasse desses danos no meio terrestre, inclusive ao ser humano, se não tratado e corrigido

exemplos como o acidente de Exxon Valdez e a doença de Minamata demonstram o quão devastador podem ser esses efeitos.

Preocupações quanto a qualidade da água dos rios amazônicos tem sido foco de vários estudos, em especial após a identificação de altas concentrações de metais pesados na ictiofauna local bem como contaminações dos corpos hídricos em vários pontos da região e a constatação dos seus efeitos em comunidades indígenas e ribeirinhas.

Os acidentes do porto de Barcarena no rio Pará e derramamentos frequentes de combustíveis fósseis no corpo de rio Negro e seus portos reforçam a necessidade de um monitoramento contínuo e cuidadoso das áreas portuárias principalmente diante do aumento constante da movimentação cargueira na região.

Este trabalho é um tímido início ao monitoramento das áreas portuárias de Santarém e Itaituba, oferecendo dados de referências de sua ictiofauna e do meio aquático que a rodeia, podendo ser usado como referência para trabalhos futuros em áreas semelhantes. Apesar disso ainda faltam elementos para uma interpretação completa do meio aquático portuário, sendo necessário uma análise profunda dos xenobióticos presentes na água bem como uma avaliação histológica dos bioindicadores que podem ser realizados em um trabalho posterior.

8. Referências

- Agência Nacional de Águas (Brasil). Panorama da qualidade das águas superficiais do Brasil: 2012. Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA, 2012.
- ANDRADE, A. R., FELCHAK, I. M. A Poluição Urbana e o Impacto na Qualidade da Água do Rio das Antas-IRATI/PR. **Rev. Geoambiente** on-line.n.12. 2009.
- ANTAQ. **Anuário 2017**. Disponível em: "http://portal.antaq.gov.br/wp-content/uploads/2018/02/20180112_Anu%C3%A1rio_2017_v4-4-vers%C3%A3o-final.pdf". Acessado em: 20/02/2019.
- ANTAQ. **Boletins Informativos**. Disponível em: <http://portal.antaq.gov.br/index.php/boletins/>". Acessado em 20/02/2019.
- ARAUJO, F. G.; MORADO, C. N.; PARENTE, T.T.E.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; GOMES, I. D.. Biomarkers and bioindicators of the environmental condition using a fish species (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803) in a tropical reservoir in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. vol. 78, no. 2, pp. 351-359. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.167209>
- ARIAS, A.R. L, BUSS, D. F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BATISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde**. 12. 61-72.2007
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: na assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Reserch**. 472. 177-186. 2000.
- AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bioestat 5.0 Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamiraná, 2007.
- AZAQUETA, A; SLYSKOVA, J.; LANGIE, S. A. S.; GAIVÃO, I. O; COLINS, A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics*. V. 5. pp.1-8. DOI:10.3389/fgene.2014.00288.
- BAPTISTA, J. **Organochlorine contaminants in different tissues from *Platichthys flesus* (Pisces, Pleuronectidea)**. **Chemosphere** (2013). <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.028>> Acesso em 10 de novembro de 2018.
- BECKETT, PHT. Critical tissue concentrations as indicators of toxicity. **Suelos Ecuatoriales**. Bogotá. 39. 1991
- BERRA, C. M. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. Tese (Doutorado)- Instituto de CiênciasBiomédicas, Universidade de São Paulo. 2008.
- BEZERRA, I. S.; CORREIA, F. N. A poluição causada por petróleo e suas consequências para o meio marinho. **Anais...** In: i congresso nacional de engenharia de petróleo, gás natural e biocombustíveis, 2015, campina grande. Anais conepetro. Campina grande: editora realize, 2015. V. 1.
- BÍCEGO, M. C., ABESSA, D.M.S., CARR, R. S., SOUSA E. C. P. M., RACHID, B.R.F., ZARONI, L.P., GASPARRO, M.R., PINTO, Y.A., HORTELLANI, M.A., SARKIS, J. E. S., MUNIZ, P. Integrative Ecotoxicological Assessment of Contaminated Sediments in a Complex Tropical Estuarine System. **Marine Pollution: New Research**. Nova Science Publisher, Inc., 2008. p.125-161.
- BRYSON, Bill. **Breve história de quase tudo**; Tradução Ivo Korytowski. São Paulo. Companhia das Letras, 2005.

- BUCKER, Augusto; CARVALHO, Wanderson; ALVES-GOMES, José Antônio. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia viresces* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Rev. Acta Amazonica**, vol 36. 2006.
- CANO, T. M.; Efeitos deletérios e teratogênicos da exposição ao mercúrio- Revisão da literatura. **Rev. Med. e Saúde de Brasília**. V.3 n.3. p. 288-300. 2014.
- CARRASCO, KR., TILBURY, KL. and MYERS, MS., 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2136. <http://dx.doi.org/10.1139/f90-237>.
- CARVALHO, M. M.; LIRA, V.S.; WATANABE, C. H.; FRACÁCIO R. Estudo da toxicidade de metais (zinco e cádmio) sobre *Ceriodaphnia dubia*, por multivias de exposição e recuperação biológica de descendentes, **Ver. Eng Sanit Ambient** v.22 n.5 p. 961-968. 2017 DOI: 10.1590/S1413-41522017158722
- CHOUERI, P. K. **Uso do bagre amarelo (*Cathorops spixii*) como modelo biológico de exposição e efeito de contaminantes no complexo estuarino-lagunar cananéia-Peruíbe**. Tese. Universidade Federal do Paraná. 2015
- COMPANHIA DAS DOCAS DO PARÁ. **Plano de Desenvolvimento e Zoneamento Portuário**. Belém-PA, 2017.
- CRESPO-LÓPES, M. E., MACEDO, G. L., ARRIFANO, G. P.F., PINHEIRO, M. C. N., NASCIMENTO, M., Da SILVA, J. M. P.; MEDEIROS, G. R. N. GEOGRAFIA ECONÔMICA E MINERAÇÃO NO PARÁ: (Des) ordenamento territorial em Carajás. Seminário Nacional de Desenvolvimento. **Anais**. Florianópolis: UDESC. 2014.
- DELUNARDO, Frederico Augusto Cariello. **Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em *Hippocampus reidi* exposto ao petróleo**. Dissertação de mestrado em Ecologia de Ecossistemas- Centros Universitário Vila Velha, 2010.
- DIAS, D. D. **Avaliação do estresse oxidativo e atividade da δ -aminolevulínico desidratase em tecidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta a chumbo e Benzo[a]pireno**. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São José do Rio Preto, São Paulo. 2015.
- DISNER, G. R. et al. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v.11, n. 1, p. 33-42, 2011.
- DORIA, H. B.; VOIGT, C. L.; CAMPOS S. X.; RANDI, M. A. F. Metal pollution assessment in a Brazilian hydroelectric reservoir: *Geophagus brasiliensis* as a suitable bioindicator organism. **Rev. Ambient Água**. V.12 n. 4p 575-590. 2017. DOI: 10.4136/ambi-agua.2061
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, 2000.
- FERREIRA, Mailson Rafael dos Santos. **Perfil genotóxico e bioacumulação de metais em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) de tributários dos rios Negro e Solimões**. Dissertação (Mestrado) INPA, Manaus, 2014.
- FILASSI, Monique. **Impacto da intermodalidade da exportação da soja brasileira: novas rotas de escoamento**. Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2016
- FRETAS, Carlos Edwar C. E Flávia K. Siqueira-Souza. O uso de peixes como bioindicador Ambiental em Áreas de várzea da bacia amazônica. **Rev. Agroambiental**. 2009
- GALVAN, G. L.; **Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores**. Tese. Universidade Federal do Paraná. 2015
- GOMES, L.C., CHIPPARI-GOMES, A. R., MIRANDA, T. O., PEREIRA, T. M., MERÇON. J., DAVEL, V.C., BARBOSA, B. V., PEREIRA, A. C. H., FROSSARD, A., RAMOS, J. P. L. Genotoxicity effect in *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. 2019. DOI: 10.1590/1519-6984.188086.

- GONÇALVES, A. C.; PESSOA, A. C. S. Fitodisponibilidade de Cádmio, Chumbo e Crômio, em soja cultivada em argissolo vermelho eutrófico a partir de adubos comerciais. *Scientia Agraria*. V.3. n1-2. P. 19-23. 2002
- GRISOLIA, C. K.; RIVEIRO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in diferente species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**. 32. 1. 138-143. 2009.
- HEDDLE, J.A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118. 1983.
- HERCULANO, A. M. Genotoxicity of Mercury: Contributing for analysis of Amazonian populations. **Rev. Environment International**. 37. 136-141. 2011.
- HOOFTMAN, RN. and DE RAAT, WK. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, vol. 104, p. 147-152. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90136-1](http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992(82)90136-1). 1982.
- JÚNIOR, A. C. G. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais absorventes alternativos, visando a remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inc. Soc.** V.6 n.2 p. 105-113. 2013;
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res*. 544 (1).43:64.2003
- LIMA, D. P.; SANTOS C.; SILVA, R. S.; YOSHIOKA E. T. O.; BEZERRA, R. M. Contaminação por metais pesados em peixes e água da bacia do rio Cassioporé, Estado do Amapá, Brasil. *Ver. ACTA Amazonica*. V. 45. P. 405-414. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201403995>.
- LOPEZ, A. C. C.; PAIVA, V. L. G. S.; HELD, B.; QUINAGLIA, G.; SÁ, L. R. M. Avaliação anatomopatológica de acaras (*Geophagus brasiliensis*) como biomarcador de poluição ambiental da represa Billings. **Anais**. São Paulo, USP.2016
- MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L.S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, MS, Brasil. **Rev. Ambient. Água** v.10 n.1. 117-129. 2015. DOI: 10.136/ambi-agua.1500.
- MELLO, R. M. **Estudo de alterações no metabolismo de carboidratos do zebrafish (*Danio rerio*) em águas contendo cromo hexavalente**. Dissertação. Universidade La Salle. Canoas. 2017.
- MELO, F.M. **Investigação do potencial genético da microbiota de mananciais do estado de São Paulo para degradação de diferentes xenobióticos**. Dissertação. Ribeirão Preto, São Paulo. 2018
- Ministério dos Transportes, Portos e Aviação Civil. **Plano Mestre: Complexo Portuário de Santarém**.2017.
- MIRANDA, R. G.; PEREIRE, S. F. P.; ALVES, D. T. V.; OLIVEIRA, G. R. F.; Qualidade dos recursos hídricos da Amazonia- Rio Tapajós: Avaliação de caso em relação aos elementos químicos e parâmetros físico-químicos. **Rev. Ambiente e Água-** Na Interdisciplinary Journal of Applied Science. V. 4 n.2. 2009. DOI: 10.4136/ambi-agua.88
- MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135–147, 1998
- MONTANHA, F. P.; ASTRAUSKAS, J. P.; KIRNEW, M. D.; NAGASHIMA, J. C.; PIMPÃO, C. T. Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químicos. **rev. Eletrônica de medicina veterinária**. 17. 2011
- NASCIMENTO, J. F.; Avaliação dos níveis de Nitrogenio e Fosforo em criação de Tilápia em tanque-rede. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB. 2018
- NEVADO, J.J.B.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.R.; BERNADO, F.J.G.; MORENO, M.J.; HERCULANO, A.M.; NASCIMENTO, J.L.M., CRESPO-LÓPEZ, M. E. Mercury in the Tapajós river basin, Brazilian Amazon: A review. **Environment International**. V. 36. P. 593-608. 2010. DOI: 10.1016/j.envint.2010.03.011

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K. Toxicity the herbicide Atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidante enzmes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public health*. 7. 3298-3312. DOI: 10.3390/ijerph7083298. 2010

OLIVEIRA, E. S.; OLIVEIRA, G.M.T. S; MELO, N.FC.; Concentração de hidrocarbonetos alifáticos e metais pesados na zona portuária de Vila do Conde, Rio Pará- Brasil. *Re. Espacios*. V. 38 N.39.2017

OLIVEIRA, E. S.; OLIVEIRA, M. T. S.; MELO, N. F. A. C. Concentration of hydrocarbons aliphatic and heavy metals in the área of port Vila do Conde, Para river-Brazil. *Espacios*. V.38. n. 39. 2017.

OLIVEIRA, K. G.; SOUZA, L. D. Alteração das concentrações de nitrogênio e fosforo na bacia do rio Apodi-Mossoró em função dos efeitos da estiagem e espacialidade. *Blucher Chemistry Proceedings*. V3.n1.2. 2015

OLIVEIRA, T. S.; COSTA, L. M.; CRUZ, C. D. Importância relativa dos metais pesados do solo na identificação e separação de materiais de origem. *Ceres*, Viçosa, v.45, n. 260. 1998

OSÓRIO, F. H. T., SILVA, L. F. O., PIANCINI, L. D. S., AZEVEDO, A. C. B., LIEBEL, S., YAMAMOTO, F. Y.; PHILIPPI, V. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; NETO, F. F.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S.; RIBEIRO, C. A.. Chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ Sci Pollut Res*. 2013. DOI: 10.1007/s11356-013-1512-5.

PASTÓRIO, P. C. C. **Respostas fisiológicas à hipóxia gradual em neonato e juvenis da arraia cururu *Potamotrygon***. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2014.

PERRY, D. M.; WEIS, J. S.; WEIS, P. Cytogenetic Effects of Methylmercury in Embryos of the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 17, 569-574. 1988.

PETERSON, C. H.; RICE, S. D.; SHORT, JEFFREY W.; ESLER, D.; BODKIN, J. L.; BALLACHEY, B. E.; IRONS, David B. Long-term Ecosystem Response to Exxon Valdez Oil Spill. *SCIENE*. Dezembro, 2003.

PINHEIRO, M. C. N.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; GERALDO, G.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W. W.; HARADA, M.; MAGNO, C.; VIEIRA, J. L. F.; XAVIER, M. B.; BACELAR, D, R. Exposição humana ao Metilmercúrio em comunidades ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. *Rev. Sociedade de Medicina Tropical*. 3. 33. 265-269. 2000.

PINTO, L.A.F; LEE, J.M.; JONQUA, J.P.C.B. **A importância do Transporte Fluvial para a unidade operacional da Amazônia**. XXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Minas gerais. 2011.

RAMSDORF, W. A. et al. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environmental monitoring and assessment*, v. 184, n. 10, p. 5841-5849, 2012

RATH, S.; CANAES, L.S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por N-nitrosaminas. *Quim nova*. V. 32. N.8. p. 2159-2168.2009

ROCHA, Cristine Fursel. **O Transporte de Cargas no Brasil e sua Importância para a economia**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Regional do Nordeste do Rio Grande do Sul. 2015.

ROCHA, R. S.; PELEGRINI, L. S.; CAMARGO, A. A.; ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, K. *Sphincterodiplostomum musculosum* (Digenea, *Diplostomidae*) in *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, *Cichlidae*) collected in a lake at Dois Córregos, São Paulo, Brazil. *Ciência Rural*. V. 45, n. 12, p. 2223-2228. 2015. DOI:10.1590/0103-847cr20141493.

RODRIGUES, A. C. F. **Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por mistura de contaminates em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como bioindicadores de contamição ambiental**. Tese. Universidade Estadual Paulista. 2014

ROTH, B; EVERAARTS, J; SMEETS, J.M.W., WAMSTEKER, J., J., VAN D. B., M., Cytochrome P4501A induction and testosterone hydroxylation in cultured hepatocytes of four fish species. **Chemosphere**. 46, 163–72. doi:10.1016/S0045-6535(01)00054-6. 2002.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; BRAZ-MOTA S.; DUARTE, R. M.; ALMEIDA-VAL, M. F. Influence of the natural Rio Negro water on the toxicological effects of a crude oil and its chemical dispersion to the Amazonian fish *Colossoma macropomum*. **Environ Sci Pollut Res** V.23 19764–19775. 2014. DOI 10.1007/s11356-016-7190-3

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; BRAZ-MOTA, S.; DUARTE, R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Influence of the natural Rio Negro water on the toxicological effects of a crude oil and its chemical dispersion to the Amazonian fish *Colossoma macropomum*. **Environ Sci Pollut Res**. 19764–19775. 2016. DOI 10.1007/s11356-016-7190-3

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DUARTE, R. M.; GAFNON, M.M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Validation of a suite of biomarkers of fish health in the tropical bioindicator species, tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Ecological Indicators**. 443–451. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10010>. 2017.

SANTOS, G. S. **Avaliação dos efeitos do cobre em duas espécies de ciclídeos (*Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*) utilizando multibiomarcadores**. Tese. Universidade Federal do Paraná. 2018

SANTOS, G. S. **Avaliação dos efeitos do cobre em duas espécies de ciclídeos (*Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*) utilizando multibiomarcadores**. Tese (doutorado)- Universidade de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação- Curitiba. 2017

SANTOS, L. S. N.; MULLER, R. C. S.; SARKIS, J. E. S.; ALVES, C. N.; BARBO, E. S.; SANTOS, E. O.; BENTES, M. H. S. Evaluation of total Mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós River Basin, Pará, Brazil. **The Science of The Total Environment**. 261. 1-8. 2000.v

SANTOS, Patrícia Estevam dos. **Biomarcadores genotóxicos no monitoramento de estuários com diferentes níveis de contaminação utilizando peixes coletados in situ**. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo. 2009.

SANTOS, Samara Silva de. **Respostas fisiológicas, genotóxicas, histopatológicas e genéticas da espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) contaminada por naftaleno e exposta a hipóxia**. Dissertação (mestrado) INPA, Manaus, 2017.

SECRETARIA DE PORTOS. **Relatório de Gestão de 2013**. Brasília. 2014

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T.; NAPOLEÃO, S. R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Biological Sciences**. V33. N1. 107-112. 2011. DOI:10.4025/actascibiolsci.v33i1.7117.

SILVA, Admilson da Costa e; NEPOMUCENO, Júlio César. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Rev. Perquirere** V.1 n7. 167179, 2010.

SILVA, M. P. **Efeitos da exposição ao glifosato sobre biomarcadores de estresse oxidativo em Jundiás (*Rhamdia quelen*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)- Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana. 2016.

SILVA, R. R.; BRANCO, J. C.; THOMAZ, S. M. T.; CESAR, A. Convenção de Minamata: análise dos impactos socioambientais de uma solução em longo prazo. **Saúde Debate**. v. 41. N. especial. P 50-62. 2017. DOI:10.1590/0103-11042017s205

SILVA, Thiago Teixeira. ***Pimelodus maculatus* e *P. platycirris* (Siluriformes: Pimelodidae) no alto rio Paraná: caracterização morfológica, dieta e reprodução**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura. São Paulo. 2015.

SIOLI, H. 1984. The amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types, p. 127-165. In: Sioli, H. (Ed.). **The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin**. Dr. W. Junk. Publishers, Dordrecht, South Holland.

SOARES A, I.D.; ALVES, F. N.; PIOVERSAN, R. **Simulação da Dispersão de Óleo na Bacia de Santos.** 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Bahia. 2006.

SOARES-GOMES, A., NEVES, R. L., AUCÉLIO, R., VEN, P. H. V. D., PITOMBO, F. B., MENDES, C. L. T. ZIOLLI R. L. Changes and variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in fish, barnacles and crabs following an oil spill in a mangrove of Guanabara Bay, Southeast Brazil. **Mar. Pollut. Bull**, 2010. DOI:10.1016/j.marpolbul.2010.05.013.

SOUSA, E. S. **Avaliação da contaminação por mercúrio na foz do rio Tapajós e exposição ambiental à população de Santarém-Pa, Brasil.** Tese. Universidade Federal do Pará. Belém. 2016

SOUZA, S. S. **Respostas fisiológicas, genotóxicas, histopatológicas e genéticas da espécie *Colossoma macropomum* (Cuiver,1818) contaminada por naftaleno e exposta a hipóxia.** Dissertação. INPA. 2017

SZEWCZYK, Susana Beatris Oliveira. Processos Envolvidos em um Derramamento de Óleo no Mar. **anais...** In: II SEMINÁRIO E WORKSHOP EM ENGENHARIA OCEÂNICA, Rio Grande. Processos Envolvidos em um Derramamento de Óleo no Mar, 2006. v. 1. p. 46-46.

TAVARES, Carlos Eduardo C. Estimativas do escoamento das exportações do complexo soja e milho pelos portos nacionais. **Rev. Compendio de estudos CONAB.** v.6, 2017.

THOMÉ, R. G.; SILVA, P. M.; SANTOS, H. B. Avaliação de genotoxicidade de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de *Danio rerio*. **Re. Conexão Ciência.** V. 11 N. 2. 2016. DOI: 10.24862/cco.v11i2.415

TRISKA, Y. **Cálculo de Capacidade de Movimentação de Cais Portuário: Aplicação para o Terminal de Granéis Sólidos.** Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)- Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.

TUREK, J. A.; GHISI, N. C.; MATOZO, F.; NOTELO, R. B. Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000. **Luminária.** V.19.n.02.p. 06-12. 2017

UCHOA, A. C. C. **O transporte de óleo diesel como potencial fonte de poluição na região do Porto de Santana-AP.** Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Amapá, Programa de Mestrado Integrado em Desenvolvimento Regional. Macapá. 2014.

VALLS, M.; LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. **Microbiology Reviews.** 26. 327-338. 2002

VENTURA D.F., MELA, M.; RANDI M.A.F.; CARVALHO C.E.V.; PELLETIER E, OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicol Environ Saf** 68(3):426–35, doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.013. 2007

VIEIRA, E.; RIBEIRO, D.H.B. **Avaliação do potencial de impacto dos agrotóxicos no meio ambiente.** 010. Artigo em Hipertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/agrotoxicos/index.htm>. Acesso em: 4/4/2018

VILCHES, Melissa. **Análise genotóxica do rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores.** Dissertação (Mestrado) – Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

YAMAMOTO, F. Y. **Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do rio Iguaçu.** Tese. Universidade Federal do Paraná. 2016