



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE
AFLUENTES DO RIO UBERABINHA (UBERLÂNDIA-MG): UMA FERRAMENTA
PARA O BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA.**

Aluno(a): Danyele Mendes Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientadora: Prof^a. Dra Sueli Moura Bertolino

**UBERLÂNDIA-MG
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE
AFLUENTES DO RIO UBERABINHA (UBERLÂNDIA-MG): UMA FERRAMENTA
PARA O BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA.**

Aluno(a): Danyele Mendes Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dra Sandra Morelli

Co-Orientadora: Prof^a. Dra Sueli Moura Bertolino

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

**UBERLÂNDIA-MG
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48a
2018 Oliveira, Danyele Mendes, 1989
 Avaliação in vivo e in vitro do potencial citogenotóxico de afluentes do Rio Uberabinha (Uberlândia-MG) [recurso eletrônico] : uma ferramenta para o biomonitoramento da qualidade da água / Danyele Mendes Oliveira. - 2018.

Orientadora: Sandra Morelli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.845>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Água - Controle de qualidade. 3. Qualidade ambiental. 4. Água - Qualidade - Uberabinha, Rio (MG). I. Morelli, Sandra, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE
AFLUENTES DO RIO UBERABINHA (UBERLÂNDIA-MG): UMA FERRAMENTA
PARA O BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA.**

ALUNO(A): Danyele Mendes Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^ª. Dra Sandra Morelli

Examinadores:

Data da Defesa: _____ / _____ / _____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(NOME DO ORIENTADOR)

EPÍGRAFE

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará a seu tamanho original.”
Albert Einstein**

DEDICATÓRIA

Esta conquista dedico à Deus, pois com ELE sou forte e tudo posso. À minha família, pai, mãe e em especial meu irmão, que são meus exemplos, minha motivação incondicional e também meus alicerces.

AGRADECIMENTOS

Quero iniciar dizendo que o caminho foi longo e difícil, mas muito gratificante. O processo seletivo foi o primeiro passo, nervos literalmente à flor da pele, mas na sequência veio a aprovação e então as comemorações. Deu-se início a uma jornada de dois anos para a conclusão do mestrado, a qual eu não estive sozinha.

“...E é tão bonito quando a gente entende

Que a gente é tanta gente

Onde quer que a gente vá

E é tão bonito quando a gente sente

Que nunca está sozinho

Por mais que a gente pense estar...”

(Caminhos do Coração – Gonzaguinha)

A conquista dessa dissertação não seria possível sem a contribuição de outros. Desta maneira venho agradecer a estes por essa vitória.

Primeiramente devo agradecimento à Deus pela dádiva da vida e por me carregar no colo nos momentos difíceis, me mostrando sempre o melhor caminho a ser trilhado.

Ao meu querido filho, João Pedro, que mesmo não estando mais entre nós me faz sentir paz e me dá forças para continuar em frente e vencer todos os obstáculos, te amo meu príncipe.

Aos meus pais, Rosemere e Robson, pelo amor, pelas orações, pela confiança e também por terem me proporcionado a oportunidade de ter o que eles não tiveram, uma carreira acadêmica. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, partilho a alegria deste momento e o meu muito obrigada.

Este trabalho certamente não seria o mesmo sem a essencial contribuição de alguém muito especial em minha vida, meu irmão Robson Júnior. Ele que é meu exemplo, aquele que nunca mede esforços para me ajudar, que é meu companheiro, que me entende e que está comigo até o fim, incondicionalmente. Te adoro meu irmão, obrigada de coração.

Ao meu namorado, Mathias, pela incansável boa vontade em me ajudar, por compartilhar meus ideais e me incentivar a prosseguir. Enfim, por estar incessantemente ao meu lado, sendo muito mais do que eu poderia almejar.

À minha orientadora, professora doutora Sandra Morelli, pela oportunidade oferecida de fazer parte da sua equipe no laboratório de citogenética, por acreditar em mim e me acolher como uma filha. Obrigada pela compreensão, pelo carinho e imensa bondade para com todos.

Aos colegas de laboratório, Prof^a Rute, Prof^o Robson, Prof^a Sandra, à nossa técnica Tamires, os companheiros Carine, Ana Carolina, Lorena, Pedro e Thiago e em especial à Bruna, que estiveram presentes em todas as etapas da confecção desta dissertação, auxiliando nas coletas, nos experimentos e na busca incessante por explicações aos dados obtidos, obrigada pelo apoio e companheirismo.

Ao Professor Doutor Boscolli Barbosa Pereira, que muito me ensinou e auxiliou nessa jornada, indo para o campo para as coletas e compartilhando seus conhecimentos sobre a temática.

Aos colegas da Universidade Estadual de Goiás (UEG), principalmente à Professora Doutora Alcione Arruda, que foram responsáveis pelo desenvolvimento de alguns experimentos desta dissertação, ensinando metodologias e apoiando no que fosse preciso, o meu muito obrigada.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela oportunidade de realizar o mestrado e me por me fornecer maiores conhecimentos acadêmicos.

Por fim agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro durante esses dois anos de mestrado.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Localização da área de estudo. Cidade de Uberlândia, Estado de Minas Gerais (MG), Brasil, e a Bacia Hidrográfica do Rio Uberabinha..... 17
- Figura 2.** Afluentes urbanos do rio Uberabinha na cidade de Uberlândia-MG avaliados no presente estudo: Córrego Lagoinha, Córrego do Óleo e Córrego Liso. Localizados no setor urbano 19
- Figura 3.** Utilização da água na Bacia do Rio Uberabinha por atividade desenvolvida.21
- Figura 4.** Formação de micronúcleo: ação do agente clastogênico com quebra cromossômica e ação do agente aneugênico no fuso mitótico.32

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 5.** Fotos do Córrego Liso e do Córrego Lagoinha. a) Córrego Lagoinha no ponto LA2. b) Córrego Liso no ponto L2 c) Córrego Liso no ponto L3.37
- Figura 6.** Localizações dos pontos de coleta na Bacia do Rio Uberabinha. Córrego do Paula (C1); Ribeirão Bom Jardim (C2); Córrego Lagoinha 1 (LA1); Córrego Lagoinha 2 (LA2); Córrego do Óleo (OL1); Córrego Liso 1 (L1); Córrego Liso 2 (L2); Córrego Liso 3 (L3);39
- Figura 7.** Coleta de água na confluência do Córrego Liso com o Rio Uberabinha40
- Figura 8.** Organismos utilizados como bioindicadores de toxicidade nos afluentes do Rio Uberabinha. a) *Allium cepa* b) *Poecilia reticulata* c) Cultura de célula C2C12.44
- Figura 9.** Estruturas dos Bulbos de *Allium cepa* (cebola).45
- Figura 10.** Exposição de *A. cepa* ao bioensaio de citogenotoxicidade.46
- Figura 11.** Etapas da confecção das lâminas. a) raízes armazenadas em etanol 70%; b) preparação das lâminas; c) retirada da lâmina após nitrogênio líquido. ..47

Figura 12. Micronúcleos e dois exemplos de anormalidades cromossômicas observadas nas células meristemáticas radiculares de *A. cepa*: a) Micronúcleos; b) Cromossomos perdidos em anáfase; c) pontes anafásicas48

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 13. Representação gráfica da classificação do nível de qualidade da água em excelente, bom, regular, ruim, muito ruim.58

Figura 14. Gráfico de comprimento de raízes de *Allium cepa* tratadas com água dos diferentes afluentes e com os controles negativo (C- água destilada) e positivo (C+ paracetamol). Os dados representam a média \pm o erro padrão. NS: não significativo à $p < 0,05$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).59

Figura 15. Gráfico representativo do Índice Mitótico encontrado nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo)61

Figura 16. Micronúcleos de *A. cepa* corados com fluorocromo Hoescht, as setas indicam os micronúcleos. a) Micronúcleo ponto L2, Córrego Liso. b) Micronúcleo ponto L3, Córrego Liso. c) Micronúcleo controle positivo, paracetamol.62

Figura 17. Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrados nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).63

Figura 18. Células meristemáticas de *Allium cepa*, durante as fases da divisão celular: a) Prófase; b) Metáfase; c) Anáfase; d) Telófase a divisão celular.64

Figura 19. Células meristemáticas de *Allium cepa* apresentando anormalidades (a) Ponte anafásica (b) Ponte telofásica. (c) Cromossomo atrasado. (d) Cromossomo perdido. (e) Cromossomo perdido. (f) Cromossomo perdido.65

Figura 20. Gráfico representativo da frequência de aberrações cromossômicas encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de

coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).....66

Figura 21. Micronúcleos de *P. reticulata* corados com Giemsa, a seta indica o micronúcleos67

Figura 22. Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ [comparando com o controle negativo (RP *P. reticulata*)]68

Figura 23. Gráfico representando a frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ [comparando com o controle negativo (*P. reticulata*)]70

Figura 24. Curva concentração-dependente da viabilidade celular da linhagem C2C12, tratadas com amostras de água de diferentes pontos do Rio Uberabinha. Cada ponto representa média \pm erro padrão de 2 experimentos independentes..71

Figura 25. Micronúcleo encontrado em célula C2C12 binucleada.....72

Figura 26. Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em células C2C12 de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ 73

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1. Afluentes e pontos de coleta com coordenadas geográficas e especificações de localização.	38
Tabela 2. Padrões para corpos de água Classe 2.	42
Tabela 3. Classificação dos Índices de Qualidade de Água (IQA).	43
Tabela 4. Testes citogenotóxicos realizados com cada organismo modelo.	44
Tabela 5: Quantidade de Bulbos de <i>Allium cepa</i> utilizados para cada diluição e para os controles positivo e negativo.	45

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos de todos os pontos de estudo. Córrego do Paula (C1); Ribeirão Bom Jardim (C2); Córrego Lagoinha 1 (LA1); Córrego Lagoinha 2 (LA2); Córrego do Óleo 1 (OL1); Córrego Liso 1 (L1); Córrego Liso 2 (L2); Córrego Liso 3 (L3); Os dados representam a média \pm o erro padrão de 3 replicatas.	55
Tabela 7. Tabela com valores de IQA obtidos no IQAData para as análises de água dos pontos de coleta.	57
Tabela 8. Frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ [comparando com o controle negativo (<i>P. reticulata</i>)]	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC - Alterações Cromossômicas
APHA- *American Public Health Association*; Associação Americana de Saúde
APP – Área de Preservação Permanente
C2C12 – Mioblasto murinho
CN - Controle Negativo
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP - Controle Positivo
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgoto
ETA - Estação de Tratamento de Água
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGAM – Instituto Mineiro de Gestão de Águas
IM - Índice Mitótico
IQA – Índice da Qualidade da Água
MG – Minas Gerais
MN - Micronúcleos
ND - Não Detectável
OD - Oxigênio dissolvido
OECD – Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PC - Perda Cromossômica
pH - Potencial hidrogeniônico
STD – Sólidos Totais Dissolvidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Caracterização da área de estudo	17
1.2. Qualidade ambiental dos recursos hídricos	21
1.3. Biomonitoramento da qualidade da água	24
1.4. Testes citotóxicos e genotóxicos	28
1.5. Bioensaios <i>in vivo</i>	30
1.5.1. <i>Allium cepa</i>	30
1.5.2. Peixes	33
1.6. Bioensaios <i>in vitro</i>	34
1.6.1. Cultura de células	35
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVO	36
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1. Locais de coleta	37
5.2. Coleta de água	40
5.3. Análise dos parâmetros físico-químicos dos recursos hídricos	41
5.4. Cálculo do Índice de Qualidade da Água (IQA)	42
5.5. Bioensaios <i>in vivo</i>	43
5.5.1. <i>Allium cepa</i> (cebola)	44
5.5.2. <i>Poecilia reticulata</i> (peixe)	48
5.6. Bioensaios <i>in vitro</i>	49
5.7. Análises estatísticas	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1. Parâmetros Físico-químicos dos recursos hídricos	52
6.2. Índice de Qualidade de Água (IQA)	57
6.3. Bioensaios <i>in vivo</i>	58
6.3.1. <i>Allium cepa</i>	58
6.3.2. <i>Poecilia reticulata</i>	66
6.4. Bioensaios <i>in vitro</i>	70
7. CONCLUSÃO	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

A qualidade hídrica de diversos cursos de água tem sido reduzida devido ao aumento considerável de contaminantes, principalmente de origens antrópicas, nos ecossistemas aquáticos. Diante deste cenário, torna-se imprescindível o biomonitoramento da qualidade ambiental destes locais para se entender a problemática e assim levar à proposição de ações voltadas ao manejo adequado destes locais. O Rio Uberabinha é o principal curso d'água responsável pelo abastecimento da cidade de Uberlândia-MG e vários trabalhos científicos apontam uma crescente degradação nesse local. Visto isso, o presente estudo teve como objetivo realizar o biomonitoramento da qualidade da água em alguns afluentes deste rio, por meio de testes citogenotóxicos em organismos modelo. A coleta de água foi realizada em cinco afluentes: Córrego do Paula (C1), Ribeirão Bom Jardim (C2), Córrego Lagoinha (LA1 e LA2), Córrego do Óleo (OL1) e Córrego Liso (L1, L2 e L3), sendo estas submetidas também a análises físico-químicas e Cálculo do Índice da Qualidade da Água (IQA). Para avaliar o potencial citogenotóxico da água dos afluentes foram realizados bioensaios *in vivo* utilizando *Allium cepa* e *Poecilia reticulata* e *in vitro* com células C2C12. Os resultados obtidos na análise dos parâmetros físico-químicos apresentaram muitas desconformidades, uma delas foi a presença de metais pesados Cádmio e Chumbo. O IQA classificou os afluentes C1 e C2 como "BOM" e os demais como "RUIM". Para citotoxicidade os testes foram: tamanho de raízes, Índice Mitótico e viabilidade celular. As amostras de água não apresentaram efeitos citotóxicos, ao contrário, demonstraram proliferação celular. Para genotoxicidade os testes foram: micronúcleo (MN), aberrações cromossômicas e anormalidades celulares. A maioria dos afluentes apresentaram um alto potencial genotóxico, havendo aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos de todos bioensaios. As alterações nos parâmetros físico-químicos e os efeitos citogenotóxicos observados podem estar correlacionados, e a consequência desses resultados pode ser devido aos descartes de efluentes domésticos e industriais nos locais que, de acordo com as análises de água, apresentaram Cádmio e Chumbo, agentes capazes de causar danos no material genético.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade; Genotoxicidade; Teste do Micronúcleo; *Allium cepa*; *Poecilia reticulata*; Cultura de Células.

ABSTRACT

The water quality of several watercourses has been reduced due to the considerable increase of contaminants, mainly of anthropic origin, in the aquatic ecosystems. In this scenario, it is essential to biomonitoring the environmental quality of these sites to understand the problem and thus lead to the proposal of actions aimed at the proper management of these sites. The Uberabinha River is the main watercourse responsible for the supply of the city of Uberlândia-MG and several scientific works point to a growing degradation in this place. Considering this, the present study had as objective to perform the biomonitoring of water quality in some tributaries of this river, through cytotoxic tests in model organisms. The water collection was carried out in five tributaries: Córrego do Paula (C1), Ribeirão Bom Jardim (C2), Córrego Lagoinha (LA1 and LA2), Córrego do Óleo (OL1) and Córrego Liso (L1, L2 and L3) being also submitted to physical-chemical analysis and Water Quality Index (IQA) calculation. To evaluate the cytotoxic potential of the water from the tributaries, *in vivo* bioassays were performed using *Allium cepa* and *Poecilia reticulata* and *in vitro* with C2C12 cells. The results obtained in the analysis of the physical-chemical parameters presented many non-conformities, one of them was the presence of heavy metals Cadmium and Lead. The IQA classified the tributaries C1 and C2 as "GOOD" and the others as "BAD". For cytotoxicity the tests were: root size, Mitotic Index and cell viability. The water samples did not present cytotoxic effects, on the contrary, demonstrated cellular proliferation. For genotoxicity the tests were: micronucleus (MN), chromosomal aberrations and cellular abnormalities. Most of the tributaries presented a high genotoxic potential, with a statistically significant increase in the frequency of micronucleus of all bioassays. The changes in the physico-chemical parameters and the cytotoxic effects observed may be correlated, and the consequence of these results may be due to the discards of domestic and industrial effluents in the places that, according to the water analysis, presented Cadmium and Lead, agents capable of causing damage to the genetic material.

KEYWORDS: Cytotoxicity; Genotoxicity; Micronucleus Test; *Allium cepa*; *Poecilia reticulata*; Cell Culture.

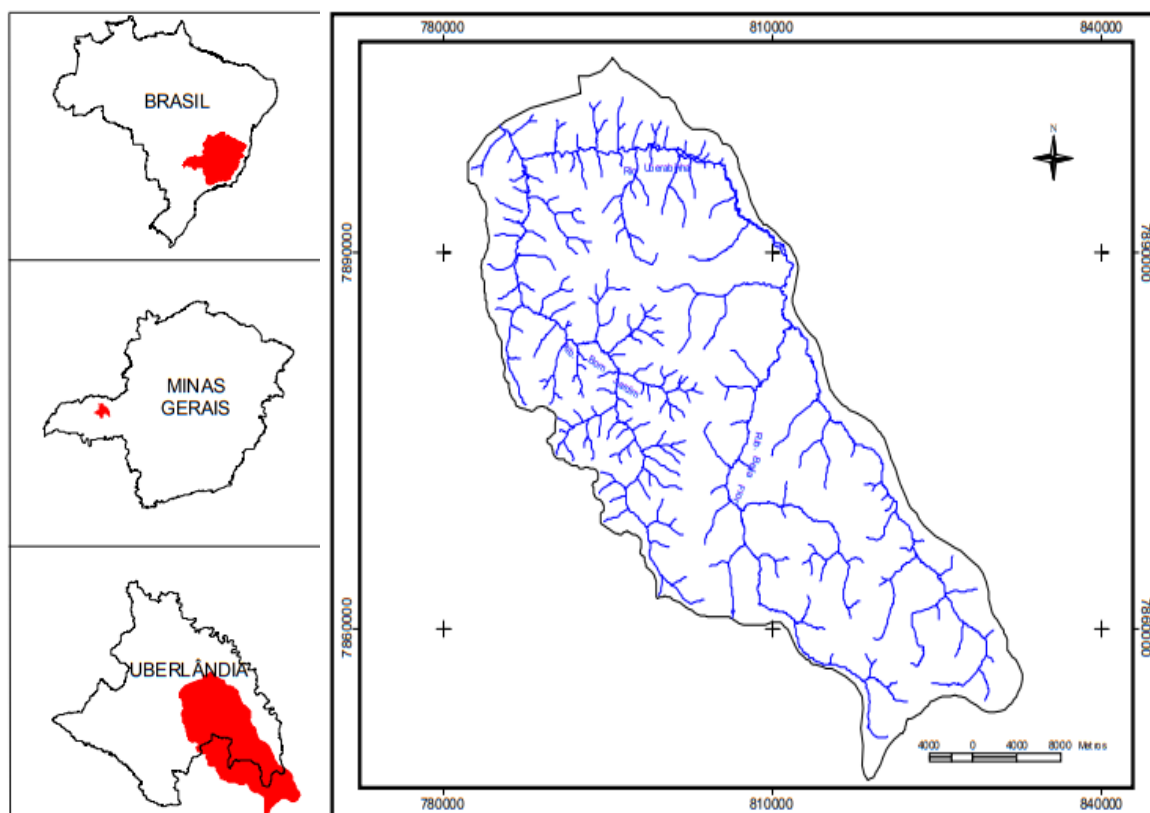
1- INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da área de estudo

O município de Uberlândia localiza-se na porção sudoeste do estado de Minas Gerais (Figura 1), região denominada Triângulo Mineiro, entre as coordenadas 18° 55' 07" S e 48° 16' 38" W (BERNARDES; SILVA, 2007). O clima é tropical, caracterizado por um período marcadamente seco nos meses de maio a setembro, e outro úmido nos meses de novembro a março (CARRIJO; BACCARO, 2000).

A Bacia do Rio Uberabinha (Figura 1) está inserida no Triângulo Mineiro e abrange o perímetro de três municípios, Uberaba, Uberlândia e Tupaciguara, ocupando principalmente o município de Uberlândia, 37% da área. Possui uma superfície de 1.276 Km², com aproximadamente 145 km de extensão desde a sua nascente até sua foz, tendo 49 afluentes ao longo de seu curso (DMAE, 2015).

Figura 1. Localização da área de estudo. Cidade de Uberlândia, Estado de Minas Gerais (MG), no Brasil, e a e a Bacia Hidrográfica do Rio Uberabinha.



Fonte: Cartas Topográficas do IBGE. Escala 1:100000. BERNARDES, M. B. J.; SILVA, M. K. A., 2005.

Alguns dos afluentes do Rio Uberabinha na cidade de Uberlândia são: na zona rural, Córrego do Jacaré, Córrego do Carçoço, Córrego do Paula, Córrego do Roncador, Córrego do Abril, Ribeirão Beija-flor e Bom Jardim, Rio das pedras; e na área urbana, Córrego Liso, Córrego Cajubá, córrego São Pedro, Córrego das Tabocas, Córrego do Óleo, Córrego Jataí, Córrego Lagoinha, Córrego do Salto, Córrego Guariba, córrego do Lobo, Córrego Moji, Córrego do Cavalo, Córrego do Vinhedo, Córrego Buritizinho. Na área urbana o município de Uberlândia possui um total de 22 córregos, quatro dos quais se encontram totalmente canalizados, sendo que muitos desses afluentes atualmente encontram-se com graus variados de degradação (CAMPOS; VILELA, 2008).

Os impactos encontrados nestes recursos hídricos são em grande parte ocasionados por uma intensa ocupação antrópica nas redondezas destes afluentes, principalmente pelo fato destas áreas receberem despejos de efluentes domésticos e também industriais (BRITES; RANTIN, 2004).

O Córrego Liso (Figura 2) é um dos principais afluentes do Rio Uberabinha e está localizado em uma região de intensa atividade industrial do município de Uberlândia, em que diversas atividades são desenvolvidas, entre elas: processamento de alimentos de origem vegetal e animal, abatedouros, curtumes, cerâmica, entre outras. (VASCONCELOS, 2012).

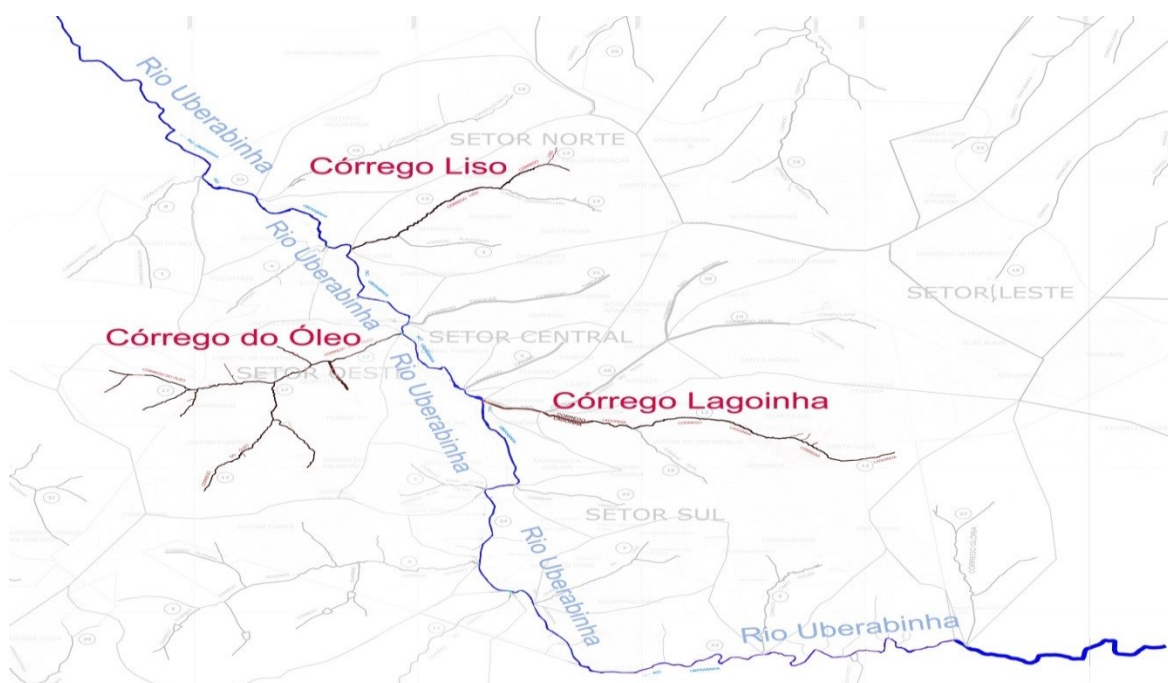
A sub-bacia do Córrego Liso ocupa uma área aproximada de 15,78 km². Além de estar localizado no Setor Industrial, o córrego ainda é rodeado por treze bairros urbanizados. Devido a esse elevado grau de ocupação, o córrego apresenta indicadores de degradação ambiental típicos de áreas onde a urbanização não foi acompanhada por ações de minimização de impactos. As margens do Córrego Liso foram ocupadas desde os primeiros anos de crescimento significativo da cidade, mas ainda possui algumas áreas verdes destinadas à conservação ambiental no Parque Municipal Victório Siquierolli e no Parque do Distrito Industrial (PÉRES, 2005).

Outro importante afluente da bacia do Rio Uberabinha é o Córrego Lagoinha (Figura 2) com 6,4 km de comprimento. Os impactos ambientais já se iniciam em sua nascente, isso devido ao fato da área de preservação permanente desse local não estar protegida de maneira adequada. Após os primeiros bairros até o centro o reflexo da degradação é eminente, esgotos domésticos, depósitos de lixo, mata

ciliar eliminada deixando o córrego exposto, ocupação inadequada da população com abastecimento de água e energia ilegais e sem rede de esgoto legalizada, sendo este último escoado “in natura” para o córrego, e outros diversos problemas ambientais. Após o bairro Lagoinha a água do córrego continua poluída, porém sua APP se encontra preservada, sendo que no local há um trabalho de revegetação por parte dos moradores do bairro Karaíba (CAMPOS; VILELA, 2008).

O Córrego do Óleo (Figura 2), também afluente do Rio Uberabinha, se localiza no setor oeste da cidade de Uberlândia e sua bacia hidrográfica ocupa uma área que corresponde a aproximadamente 10% do perímetro urbano. Neste Córrego também há ocupação irregular das margens do córrego nas áreas próximas à nascente, grande quantidade de resíduos sólidos espalhados e desmatamento da mata de galeria. Esta abrangência faz com que haja uma dinâmica direta com a população do seu entorno, que assim como no Córrego Lagoinha, resulta em vários tipos de impactos neste afluente (FARIAS et al, 2009).

Figura 2. Afluentes urbanos do rio Uberabinha na cidade de Uberlândia-MG avaliados no presente estudo: Córrego Lagoinha, Córrego do Óleo e Córrego Liso. Localizados no setor urbano.



Fonte: Autoria própria. Dados bacia do Rio Uberabinha SEPLAM Prefeitura de Uberlândia, 2016.

O Ribeirão Bom Jardim, outro afluente do Rio Uberabinha, localiza-se entre as porções sul do município de Uberlândia, tendo sua nascente na cidade de

Uberaba-MG, trata-se de um dos principais afluentes do rio Uberabinha e drena uma área de 396,54 km², cujo perímetro é de 108,848 quilômetros (BRITO, 2001). Sua extensão, segundo dados do DMAE 2015, equivale a 25 km e nele há um represamento para a captação de água, sendo esta levada até a Estação de Tratamento de Água (ETA) desse afluente. Desta forma, trata-se de uma importante fonte de abastecimento da cidade que se localiza no perímetro rural, podendo assim ser utilizado como ponto controle para a presente pesquisa.

O Córrego do Paula é um afluente pouco relatado na bibliografia, se localiza no setor rural da cidade, não recebendo assim grande influência da poluição urbana, o que faz dele um potencial ponto controle para o estudo em questão.

O IGAM, por meio do Projeto Águas de Minas, realiza o monitoramento das águas superficiais e subterrâneas de Minas Gerais desde 1997, o que permite identificar alterações na qualidade das águas do Estado, possibilitando a proposição de ações de planejamento e controle de usos das mesmas (IGAM, 2007).

De acordo com o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), no ponto a jusante do Rio Uberabinha em relação à cidade de Uberlândia, as análises de água indicaram elevadas concentrações de fósforo total, estando relacionadas diretamente com o lançamento de esgotos sanitários, sem tratamento prévio. Apresentou ainda ocorrência de coliformes termotolerantes, fósforo total e demanda bioquímica de oxigênio em desconformidade com o limite estabelecido pela legislação para corpos de água de Classe 2 (CONAMA nº357, 2005).

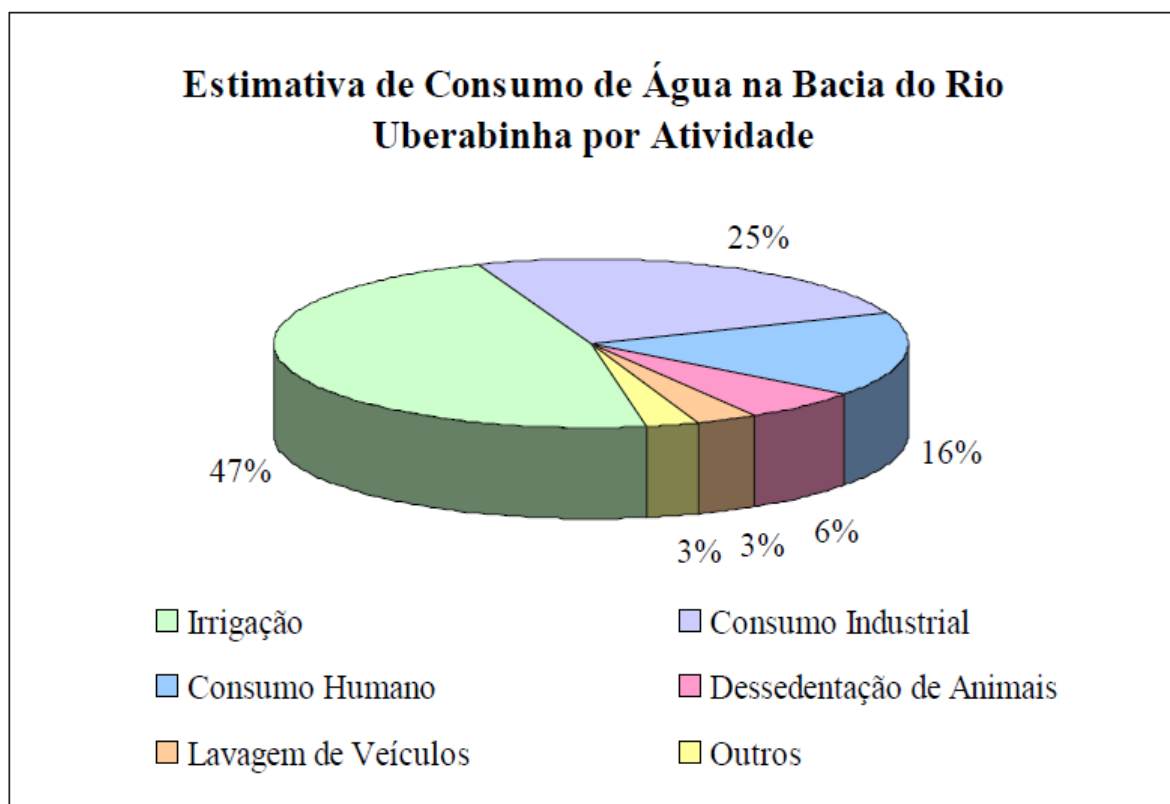
Cabe ressaltar que o Rio Uberabinha é o principal curso d'água responsável pelo abastecimento da cidade e suas águas são usadas para consumo público, geração de energia e irrigação. Na escala da bacia, o rio principal e seus afluentes são capazes de detectar as mudanças ambientais em toda a bacia, ou seja, alterações nas correntes superiores influenciam os cursos inferiores (MORENO, P.; et al 2009). Deste modo, os esgotos lançados no Córrego Liso (REZENDE, P. S.; et al 2012) e em outros afluentes poluem e contaminam a água não somente dos próprios córregos, mas também do Rio Uberabinha que é receptor desses afluentes e também de toda a bacia hidrográfica, podendo acarretar problemas à saúde da população que utiliza essa água e disseminar vetores de várias doenças.

Dessa forma, é de grande relevância o monitoramento da qualidade ambiental destes afluentes, já que eles influenciarão diretamente na qualidade da água do Rio Uberabinha.

1.2. Qualidade ambiental dos recursos hídricos

A água representa um recurso de fundamental importância para a manutenção da vida e, além de manter o equilíbrio do meio ambiente, se trata de um elemento indispensável para quase todas as atividades humanas, tais como: consumo dos seres vivos; irrigação de culturas agrícolas; geração de energia elétrica; abastecimento doméstico e industrial; recreação; dentre outras. A estimativa de consumo de água no Rio Uberabinha por atividade na cidade de Uberlândia está demonstrada na figura 3.

Figura 3. Utilização da água na Bacia do Rio Uberabinha por atividade desenvolvida.



Fonte: BORGES, R. F. (2008).

A água se trata de um elemento essencial para a vida, para o meio ambiente e para o desenvolvimento econômico e social. Os rios possibilitaram a formação

das primeiras civilizações urbanas, sendo que muitas das primeiras cidades do mundo se formaram próximas aos rios a fim de garantir o abastecimento da população e favorecer as comunicações e o comércio (BAPTISTA; CARDOSO, 2013).

Desta maneira, a relevância destes recursos hídricos é nítida e também versátil, por exemplo quando estes recursos são utilizados tanto como pontos de captação de água para abastecer áreas metropolitanas, e também receptores de descarga de águas residuais. Porém a recepção de descargas pode perturbar o ambiente de tal modo que a degradação dos contaminantes ali presentes e restauração do equilíbrio natural não são possíveis, levando a um impacto ambiental de difícil reversão nesses locais (DAHSHAN et al., 2013; KAUR; DUA, 2015).

Neste contexto, Borges (2010) relata que uma das maiores preocupações das sociedades consiste na utilização racional dos recursos hídricos pelo homem. Em razão da escassez de água em algumas regiões do país e também dos problemas relacionados com a qualidade das águas, a procura por maneiras de solucionar estes impasses vem ganhando atenção. Isto pode ser verificado pelo crescente número de estudos na área e pela elaboração de leis específicas para a sua gestão, nas quais a água passa a ser tratada como um recurso natural escasso e limitado.

Dentre as cartas legais, pode-se citar a Lei 9.433 de 07 de janeiro de 1997, que estabelece a Política Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos e a Lei 9.984 de 17 de julho de 2000, que instituiu a Agência Nacional de Águas (ANA). O Órgão federal tem como função a implementação da referida Política, assim como a coordenação do Sistema de Gerenciamento de Recursos Hídricos.

O rápido desenvolvimento da indústria e da agricultura tem resultado no aumento da poluição dos rios e lagos com metais pesados, o que é indicado como significativo risco ambiental e também representa riscos para os organismos vivos que fazem parte do ecossistema, como os invertebrados, peixes e humanos (BIDAR et al.2009). Poluentes libertados em cursos de água alteraram a composição físico-química da água, formando misturas complexas que podem provocar efeitos tóxicos e genotóxicos em organismos vivos (MERLO et al, 2011).

Rashed (2001) relata que a biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão. A disposição inadequada de resíduos sólidos, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de lixos químicos, e o lançamento de efluentes domésticos, urbanos e industriais, contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos e outros, o que influencia diretamente na qualidade das águas (FILHO et al., 2012).

Afluentes de áreas urbanas, em especial, enfrentam graves problemas de qualidade de água devido à descarga de produtos de esgoto domésticos não tratados, resíduos municipais e efluentes industriais, levando ao aumento, principalmente, da toxicidade metálica nestes locais (VENUGOPAL et al., 2009; SEKABIRA et al., 2010).

Os metais pesados, quando em altas concentrações no meio aquático, são conhecidos por sua toxicidade persistente e tendência para se bioacumular no ecossistema (ATLI e CANLI 2010). Essas substâncias tóxicas tendem a persistir indefinidamente no meio ambiente, comprometendo o bem-estar e o equilíbrio não só da fauna e flora existente nesse ecossistema, mas também da saúde das pessoas que vivem nas comunidades vizinhas, através da acumulação e entrada na cadeia trófica (FAROOQ, U. et al, 2010).

Os principais metais pesados poluentes são: chumbo (Pb), cromo (Cr), zinco (Zn), e mercúrio (Hg) (STRBAC et al., 2015). Os sedimentos tem alta capacidade de acumular metais pesados e desempenham um importante papel na determinação da qualidade da água dos córregos e rios (VARDY et al., 2015).

De acordo com Cruvinel (2009) os impactos ambientais e a diminuição da qualidade ambiental das águas do Córrego Liso são percebidos no próprio local e após a realização da análise da qualidade da água os resultados obtidos evidenciaram a contaminação dos sedimentos do Córrego Liso pelos metais Cd, Cu, Cr e Pb, apresentando valores acima do mínimo estabelecido pela Resolução CONAMA 344/04.

Em 2005 o Conselho Nacional do Meio Ambiente pela resolução de nº. 357 (CONAMA, 2005) determinou diretrizes ambientais para o enquadramento da qualidade da água, bem como estabeleceu condições e padrões de lançamento de

efluentes. O Conselho Nacional do Meio Ambiente é o responsável por definir a classificação da qualidade da água no Brasil e determinar os níveis físicos e químicos aceitáveis que são seguros para os organismos usarem este recurso (BARBERIO et al., 2011). O descarte de efluentes que contém metais pesados fora dos padrões da legislação ambiental vigente, bem como a sua incorreta manipulação nos diversos ecossistemas naturais, ocasionam danos ao meio ambiente, o que torna de fundamental importância o monitoramento e o surgimento de possíveis soluções para resolução destes contaminantes no ecossistema.

O impacto ambiental gerado pelo descarte de substâncias tóxicas no meio ambiente levou a comunidade científica a desenvolver diferentes métodos para a resolução destes problemas (SALA et al, 2010). Dentre as ferramentas para auxiliar a gestão e conservação dos Recursos Hídricos está o biomonitoramento, que vem sendo amplamente utilizado para essa finalidade.

1.3. Biomonitoramento da qualidade da água

De acordo com dados da Agência Nacional das Águas (2001) o acelerado crescimento demográfico e o desenvolvimento econômico e tecnológico têm causado um aumento na demanda por água, o que gera diversos conflitos entre seus usuários e que, possivelmente, se não forem adotadas medidas eficazes para sua gestão, incorrerá na escassez desta em um futuro muito próximo.

O monitoramento e avaliação da qualidade da água, como importante ferramenta na gestão de recursos hídricos, passa pela obtenção de dados confiáveis dos corpos d'água de interesse. Os teores máximos de impurezas permitidos na água constituem os padrões de qualidade, que devem ser cumpridos, mediante a legislação que estabelece limites individuais para cada substância, em função do uso previsto para a água (VASCONCELOS, 2012).

Vários contaminantes, tanto orgânicos quanto inorgânicos, são despejados cotidianamente no ambiente aquático, alterando assim a qualidade ambiental, além de serem absorvidos pela biota residente no local contaminado. Neste contexto, existe uma grande demanda por análises da qualidade do ambiente em sua totalidade. Os métodos para o monitoramento da saúde ou qualidade ambiental podem ser divididos em análises que: (1) detectam poluentes e os quantificam, em meios físicos e biológicos, e (2) avaliam a poluição em organismos vivos, seja no

indivíduo isolado, a nível populacional ou a nível de comunidade. Esses métodos têm sido empregados há vários anos e nenhum deles é exclusivo e analisados de forma isolada, não fornecendo informações completas sobre o status ambiental (ATHIRA; JAYA, 2018).

Na legislação brasileira, a qualidade das águas superficiais ambientais é monitorada usando apenas parâmetros físico-químicos e microbiológicos (por exemplo, coliformes fecais), que são comparados com os limites nacionais estabelecidos para as respectivas variáveis e classes de água (CONAMA nº357, 2005). Águas de boa qualidade não devem apresentar variáveis que excedam as diretrizes nacionais para a contaminação ambiental, porém, para uma compreensão adequada dos riscos ecológicos para a fauna, informações específicas sobre a biodisponibilidade ou efeitos toxicológicos potenciais sobre a biota devem ser reunidos além dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Desta forma, os estudos voltados ao conhecimento das condições de uso dos recursos hídricos em bacias hidrográficas brasileiras se tornaram cada vez mais necessários, levando à proposição de ações voltadas ao manejo adequado e, com isto, evitar ou solucionar problemas relacionados à utilização da água (ARIAS *et al.*, 2007). A partir deste pressuposto, a presença de produtos químicos nos ambientes precisa ser monitorada para determinar os efeitos potenciais sobre a saúde dos animais, das plantas, e das populações humanas (GADZALA-KOPCIUCH *et al.*, 2004).

As diferentes abordagens para avaliar a qualidade da água em programas de monitoramento em ecossistema de água doce ganharam atenção crescente nos últimos 15 anos. O primeiro uso oficial de um método biológico para avaliar a qualidade da água foi em 1970, nos rios britânicos. Mais tarde, em resposta às críticas sobre a adequação do método, desenvolveram o BMWP (Grupo de Trabalho de Monitorização Biológica) que é recomendado para uso em levantamentos de poluição de rios (PINTO *et al.*, 2004).

O monitoramento da presença de xenobióticos em ambientes aquáticos pode, a partir de estudos com espécies residentes, beneficiar a qualidade do ambiente, juntamente com a saúde humana. A localização e a determinação da concentração dos poluentes podem assegurar a vida destas espécies e também

um ambiente saudável, garantindo ao homem sua utilização para alimentação, abastecimento e lazer (NICARETA, 2004).

O monitoramento ambiental, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes, utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), propicia promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA *et al.*, 2003).

O monitoramento utilizando respostas biológicas é de fundamental importância para complementar o monitoramento físico-químico, pois se trata de uma tentativa de melhorar o conhecimento sobre a identidade dos contaminantes emitidos e, subsequentemente, para proporcionar uma base para a incorporação de medidas preventivas ou de proteção (CARVALHO, 2005). Quando comparado ao método tradicional físico-químico, que são normalmente utilizados para avaliar a presença ou não de substâncias perigosas ou poluentes, fornece informações adicionais como a exposição cumulativa na biota e também a detecção de efeitos indiretos.

Por exemplo, os efeitos biológicos aditivos, sinérgicos, ou antagonistas das substâncias nem sempre são claros, porque muitos deles estão normalmente presentes em baixos níveis em águas de superfície, dando, assim, nenhuma evidência clara para o seu risco ambiental (POLLACK, *et al.* 2003). Esta lacuna no conhecimento pode ser coberta pela utilização de bioensaios com os organismos biomonitores (DEFU, *et al.* 2014).

O Biomonitoramento é definido como a utilização sistemática das respostas de variáveis biológicas para avaliar as mudanças no meio ambiente, estas geralmente causadas por ações antropogênicas. Portanto, o processo de biomonitorar envolve o uso das respostas de organismos, chamados biomonitores, para avaliar mudanças no ambiente em que vivem (BUSS *et al.* 2003). Tais organismos são escolhidos pela sua sensibilidade ou tolerância para a presença de fatores de estresse, sendo que sua abundância e comportamento refletem os efeitos do fator de estresse sobre a biota. Estes organismos atuam como sinalizadores ambientais de áreas poluídas e podem ser amplamente utilizados alertando pessoas sobre ambientes que apresentam riscos (BONADA *et al.*, 2006).

Nas áreas urbanas, os ecossistemas aquáticos são mais suscetíveis à degradação, e muitos vertebrados e invertebrados têm sido usados para monitorar a qualidade ambiental, sendo vários reconhecidos cientificamente como indicadores de poluição, embora as suas respectivas respostas sejam dependentes dos tipos de poluentes e as condições experimentais em que eles são expostos (MIELLI et al., 2009). Algas (CHARALAMPOUS *et al.*, 2015), vegetais como *Allium cepa* (KRÜGER, 2009; LEME; et al, 2009), e *Tradescantia sp.* (CAMPOS *et al.*, 2016), peixes de diversas espécies (BIANCHI, E. et al, 2015; GUTIÉRREZ; et al, 2015) e macroinvertebrados (MARLEY; et al, 2018; STENERT, 2010), são alguns exemplos de indicadores utilizados no biomonitoramento ambiental.

Quando massas de água são avaliadas por um controle ativo, bioindicadores são expostos a amostras de água durante curtos períodos que variam desde algumas horas a dias. A exposição constante da biota a substâncias tóxicas pode levar estes organismos à impactos de nível molecular, como também no organismo como um todo (JESUS E CARVALHO, 2008).

A utilização de diferentes parâmetros em estudos de biomonitoramento permite uma avaliação abrangente de ambientes que tenham sido contaminados por resíduos urbanos, industriais ou agrícolas. O monitoramento dos recursos hídricos no Brasil é amplamente estudado, sendo de extrema importância para países em desenvolvimento como o Brasil, uma vez que demonstram que a falta de gestão de resíduos pode ter efeitos negativos sobre corpos d'água e aumentar o risco de contato humano com águas contaminadas, o que pode levar a surtos de doenças devido à utilização destas águas (MAURO et al. 2014).

Nesse segmento é de grande relevância o monitoramento dos corpos hídricos, já que os mesmos além de constituírem a principal fonte para o abastecimento público de água, são utilizados também para o desenvolvimento de atividades agrícolas, na criação de animais, entre outros.

Levando em consideração que diferentes espécies são caracterizadas por sensibilidades diferentes contra uma variedade de poluentes, a análise de toxicidade deve ser realizada por uma bateria de bioensaios em espécies de diferentes níveis tróficos (SCHMIDT et al. 2002).

Ginebreda et al. (2014), relata que as águas a serem analisadas podem conter muitos compostos citogenotóxicos desconhecidos, dificilmente

determinados por análises convencionais e por isso ensaios *in vitro* de citogenotoxicidade também devem ser inclusos na avaliação da qualidade da água para eficientemente estimar a presença de substâncias tóxicas em águas de superfície (PELLACANI et al. 2006).

1.4. Testes Citotóxicos e Genotóxicos

Na maioria dos países em desenvolvimento, como o Brasil, existe uma grande escassez de recursos para a realização de importantes pesquisas científicas relacionadas ao monitoramento da qualidade da água. Assim, encontrar técnicas que possam responder hipóteses de maneira mais econômica é muito importante (LAUGHINGHOUSE *et al.*, 2012).

Análises citotóxicas combinadas com as genotóxicas permitem a previsão da toxicidade da água, especialmente se houver sinergismo, antagonismo ou potencialização de efeitos observados nos componentes presentes na água, os quais não são observáveis nos testes comuns físico-químicos. Estas análises são caracterizadas por apresentarem uma resposta global, independentemente do conhecimento de poluentes e as suas propriedades químicas (ZEGURA et al., 2009).

Diversos ensaios que avaliam a citotoxicidade e a genotoxicidade têm sido utilizados de maneira eficaz para analisar a qualidade da água de rios e córregos que recebem efluentes urbanos. Dentre os testes de citotoxicidade estão os ensaios *in vitro* utilizando culturas celulares e o teste *in vivo* utilizando o *Alium cepa*, sendo o segundo mais simples e barato (BARBÉRIO; et al, 2011).

Os ensaios citotóxicos são experimentos utilizados para avaliar a biocompatibilidade de substâncias, permitindo fornecer informações a respeito de sua segurança ou detectar danos celulares causados pela substância ou mistura avaliada. Para que o ensaio funcione é imprescindível a presença de um controle que não promova morte nem altere as funções celulares (APARECIDA *et al.*, 2008).

Dentre os ensaios *in vitro* utilizados para avaliação da citotoxicidade se destacam o MTT e o teste de redução da resazurina (comercialmente chamado de alamar blue). Por sua vez, os ensaios *in vivo* que têm sido muito utilizados para identificar poluentes potencialmente citotóxicos em ambientes aquáticos são a

avaliação do índice mitótico e comprimento de raiz no teste do *Allium cepa* (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BARBÉRIO; et al 2011).

Dentre os ensaios de genotoxicidade encontram-se o teste do micronúcleo *in vitro* utilizando cultura celular e os testes de micronúcleo *in vivo* utilizando *Allium cepa* ou peixes, que podem ser encontrados nos rios analisados ou expostos experimentalmente à água destes rios, sendo esses dois testes *in vivo* também mais simples e baratos (KOCAN; et al 1985; LAUGHINGHOUSE *et al.*, 2012; SERIANI *et al.*, 2012; KANEV, 2017).

Agentes genotóxicos são aqueles que causam mudanças na estrutura e função do DNA, provocando mutações e afetando sua integridade, podendo induzir rupturas e perdas de material genético. Testes de genotoxicidade são os protocolos que detectam a presença destes agentes genotóxicos no meio analisado. Vários organismos aquáticos têm sido utilizados como biomarcadores genéticos em diferentes ensaios para detectar os efeitos de contaminantes ambientais. Embora não sejam aquáticos, alguns bioensaios de plantas, como o de micronúcleo em *Allium cepa*, também permitem a detecção da atividade genotóxica de efluentes ou áreas contaminadas (TORRES DE LEMOS *et al.*, 2007; DA ROCHA *et al.*, 2018).

Desta forma, estudos sobre a citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias e elementos químicos, se revestem de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por poluentes, permitindo ainda avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas, efeitos sobre o material genético e ainda possíveis efeitos sobre as populações, uma vez que estas substâncias podem atuar de maneira a diminuir a variabilidade genética da população. Deve-se ressaltar que devido à variedade de possíveis efeitos de um xenobiótico, um teste isolado não é suficiente para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo. Também deve-se considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos às espécies estudadas (FRENZILLI; et al 2008).

1.5. Bioensaios *In Vivo*

A necessidade de se obter informações não reveladas pela simples caracterização física e química tem estimulado a realização de diferentes testes que atualmente são considerados como análises indispensáveis para um controle

mais abrangente das fontes de poluição das águas. Os bioensaios de toxicidade *in vivo* são utilizados para esse controle da qualidade do meio ambiente, principalmente nos ambientes aquáticos. Nesse tipo de teste são utilizados organismos vivos como indicadores de efeitos tóxicos do ambiente. Através destas análises determina-se o potencial tóxico de um agente químico ou de uma mistura complexa, sendo os efeitos desses poluentes medidos através da resposta de organismos vivos (WILLIAMS et al, 2002).

A ideia de que organismos vivos podem indicar a qualidade do meio ambiente é amplamente difundida e os testes experimentais possuem metodologias distintas estabelecidas de acordo com os diversos objetivos que se procuram alcançar nas avaliações. A escolha do bioensaio mais adequado deve considerar os seguintes fatores: sensibilidade, distribuição geográfica, abundância, importância ecológica e relevância do organismo indicador (REGINATTO, 1998).

1.5.1. Ensaio com *Allium cepa*

Os bioensaios com plantas superiores têm sido recomendados desde a década de 70 para avaliação, monitoramento e detecção de agentes citogenotóxicos no ambiente. Dentre as espécies vegetais, a cebola (*Allium cepa* L.) é um eficiente sistema-teste para medir o potencial citogenotóxico de produtos poluidores no ambiente por apresentar características como: crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em processo de divisão, adaptação a diferentes meios de cultivos, sua disponibilidade durante todo o ano, baixo custo, seu fácil manuseio, por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho e também pela alta sensibilidade e correlação com outros bioensaios (COSTA et al., 2015; ABDELMIGID, 2013).

O teste de *Allium cepa* é uma valiosa ferramenta de monitoramento ambiental para a detecção do potencial genotóxico das substâncias lançadas no ambiente (OLIVEIRA et al., 2011; BRAGA e LOPES, 2015), e vem sendo indicado por alguns órgãos e programas: IPCS (*International Programme on Chemical Safety* – Programa Internacional de Segurança Química), UNEP (*United Nations Environment Programme* – Programa Ambiental das Nações Unidas) e a USEPA (*US Environmental Protection Agency* – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) (KHAN et al., 2011).

O uso de *Allium cepa* como material teste foi originalmente introduzido por Levan (1938) e, em seguida, diversos autores têm indicado o referido sistema como um excelente modelo *in vivo* para avaliação de toxicidade de inúmeras substâncias (FISKESJÖ, 1985; BARBÉRIO, 2013;) e, em particular, de poluentes aquáticos (PATHIRATNE et al., 2015; HEMACHANDRA et al, 2017; RAHMAN, et al 2017).

Fiskesjo (1994), defende a importância do uso de sistemas vegetais para o biomonitoramento ambiental, salienta que embora existam diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, tais como o importante sistema de oxidase e, que a ativação de pró-mutágenos em plantas tem alta relevância, uma vez que seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos. Comparando com o sistema teste de mamíferos, o teste *A. cepa* indica correlação de 82% em relação ao teste de carcinogenicidade em roedores, além de ter quase a mesma sensibilidade do sistema-teste de algas e de linfócitos humanos (FISKESJO, 1985; LEME et al., 2008).

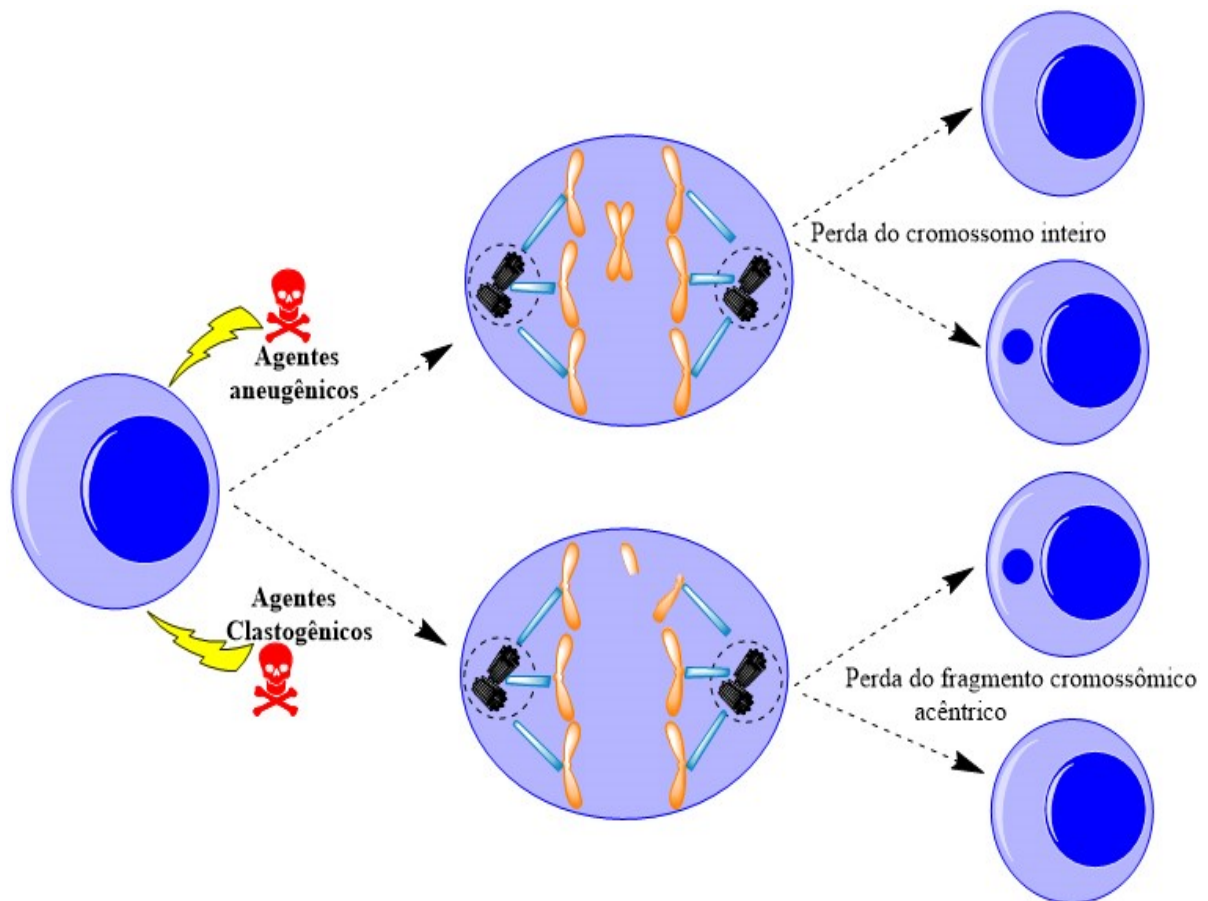
Nos ensaios com *A. cepa*, após a exposição dos bulbos de cebola à solução teste por um determinado período, é possível avaliar tanto os efeitos citotóxicos, por meio da análise do crescimento das raízes e do índice mitótico, quanto os efeitos genotóxicos, geralmente através da análise de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKEJÖ, LEVAN, 1994; TEDESCO, LAUGHINGHOUSE, 2012).

O desenvolvimento das raízes de *A. cepa* ocorre devido à frequente divisão mitótica observada em seu meristema apical. A determinação do índice mitótico e a aferição do comprimento das raízes podem ser usadas como indicadores de proliferação adequada ou não destas células quando expostas ao tratamento, demonstrando assim uma possível ação citotóxica da amostra. Para a avaliação dos efeitos ou danos que os agentes mutagênicos podem causar, faz-se necessário que a raiz exposta ao tratamento esteja em constante divisão mitótica e que um grupo não tratado seja mantido como controle (BIANCHI, 2015).

O micronúcleo é uma pequena massa de material genético, envolta por membrana, resultante da perda de fragmento(s) cromossômico(s) ou de cromossomo(s) inteiro(s), podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo, podendo ocorrer espontaneamente ou ser induzidos por agentes que danificam diretamente o cromossomo, produzindo quebras, ou por

agentes que afetam o fuso mitótico (Figura 4). Assim, a presença de micronúcleos em células somáticas é indicativa de quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou de distúrbios do fuso mitótico (aneugênese) (OBE, G.; et.al, 2002).

Figura 4. Formação de micronúcleo: ação do agente clastogênico com quebra cromossômica e ação do agente aneugênico no fuso mitótico.



Fonte: Autoria própria

A ação desses agentes clastogênicos e aneugênicos, dentre outras formas, é responsável pelo surgimento das alterações cromossômicas estruturais e numéricas. Quando essas alterações ocorrem em células somáticas humana por exemplo, podem levar à formação de neoplasias (CARRARD et al., 2007). As aberrações cromossômicas podem ser observadas e quantificadas pela análise de células mitóticas de *A. cepa* em metáfase, anáfase e telófase. As análises de aberrações cromossômicas também podem identificar separadamente os efeitos clastogênicos, pela presença de pontes e fragmentos cromossômicos, e os efeitos aneugênicos, devido a alterações do fuso mitótico, pela presença de cromossomos retardatários (FISKEJÖ, 1985).

Devido ao grande número de células que podem ser analisadas, a técnica de micronúcleo representa uma maneira simples e precisa de se estimar dano genético induzido, constituindo-se em uma ferramenta amplamente aplicável para testar o efeito de compostos químicos sobre as células (EL-SHAHABY, 2003).

1.5.2. Peixes

Nos últimos anos, os peixes têm recebido uma atenção especial no biomonitoramento. Diversas espécies destes organismos, que são a base do desenvolvimento dos vertebrados, têm sido extensivamente utilizadas como monitores biológicos, inclusive em análises genotóxicológicas. Os peixes representam o nível trófico final na rede alimentar aquática e reagem sensivelmente às mudanças ambientais, estando em contato direto com as descargas de poluentes ambientais. Uma vez que os peixes respondem a substâncias tóxicas de forma semelhante a vertebrados superiores, como os mamíferos, eles têm sido frequentemente utilizados para pesquisar substâncias químicas com potencial para causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; TORRES DE LEMOS *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2016).

Um dos ensaios de atividades genotóxicas amplamente utilizados em peixes é o teste de micronúcleos em eritrócitos. O uso de peixes como bioindicadores permite uma avaliação fiável da presença de fontes poluentes que poderiam potencialmente causar efeitos genotóxicos, uma vez que estes animais têm a capacidade de concentração e metabolização de poluentes aquáticos (BOLOGNESI E HAYASHI, 2011).

São considerados adequados para uso no controle de poluição em sistemas aquáticos por serem altamente sensíveis a vários contaminantes, capazes de responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações, sofrerem bioacumulação, ocuparem posições diferentes dentro da cadeia alimentar e assim transferir energia e biomassa entre níveis tróficos e por serem facilmente manuseáveis em laboratório (NWANI, C.D, et al, 2010).

Várias espécies de peixes têm sido frequentemente usadas para detectar e avaliar os efeitos biológicos dos contaminantes introduzidas em corpos d'água, podendo apresentar respostas letais e subletais a produtos químicos. Além disso, a presença de poluentes no ambiente pode causar o estresse, levando a alterações

a níveis moleculares, fisiológicos, histológicos, ou respostas comportamentais. A espécie *Poecilia reticulata* é descrita pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD) como organismo-teste para estudos de ecotoxicidade, isso porque apresentam uma ampla distribuição e por serem sensíveis à diversas substâncias tóxicas (OECD, 1992).

P. reticulata pertence à Família dos Poeciliidae, comumente conhecido como guppy. Esta é uma espécie amplamente distribuída por toda a região Neotropical, é um peixe pequeno e fácil de manusear em aquários, também sendo fácil a obtenção e processamento de materiais para análise, como células, tecidos e órgãos (CAVAS, T. 2003). São excelentes modelos para biomonitoramento de produtos químicos tóxicos no ambiente aquático, podendo acumular substâncias tóxicas e responder a baixas concentrações de agentes mutagênicos. Portanto, eles se tornaram um importante organismo sentinela para avaliar a citogenotoxicidade. (SIBANDA, T. et al. 2015).

1.6. Bioensaios *In Vitro*

Testes de toxicidade em animais são frequentemente utilizados para investigar os efeitos de contaminantes ambientais em espécies aquáticas, porém tais testes são limitados pelo número de animais que podem ser economicamente e convenientemente estudados e por problemas na obtenção de organismos com características já descritas (KOCAN; SABO; LANDOLT, 1985). Neste contexto, o uso de sistemas *in vitro* se mostra uma ferramenta efetiva para responder perguntas de ordem toxicológica.

Dentre as metodologias alternativas *in vitro* de monitoramento ambiental têm-se aquelas que se utilizam de linhagens celulares, pois estas podem ser aplicadas em diversos ensaios de citogenotoxicidade devido à sua fácil manipulação e sensibilidade quando expostos a agentes químicos e físicos, e também por apresentarem uma boa reprodutibilidade (MORALES, de 2008; ZEGURA et al, 2009).

1.6.1. Cultura de células

O uso dos sistemas de cultura de células e tecidos para o estudo de substâncias tóxicas é amplamente difundido pela comunidade científica. Vários toxicologistas demonstraram que células de diferentes espécies respondem da

mesma maneira a vários agentes mutagênicos/carcinogênicos, tornando possíveis os estudos de respostas tóxicas básicas em sistemas menos complexos do que as análises *in vivo*.

Testes de toxicidade em animais são frequentemente utilizados para investigar os efeitos de contaminantes ambientais em espécies aquáticas, porém tais testes são limitados pelo número de animais que podem ser economicamente e convenientemente estudados e por problemas na obtenção de organismos com características já descritas (KOCAN; SABO; LANDOLT, 1985). Neste contexto, o uso de sistemas *in vitro* se mostra uma ferramenta efetiva para responder perguntas de ordem toxicológica.

Os ensaios *in vitro* usando linhagens celulares são altamente específicos e sensíveis para caracterizar os mecanismos de toxicidade, como citotoxicidade e genotoxicidade, não apenas para substâncias isoladas, mas também para misturas complexas de poluentes que estão presentes em amostras ambientais, (HEINRICH *et al.*, 2017), como as amostras de águas poluídas por efluentes urbanos.

Vários testes são usados para análise de citotoxicidade *in vitro* e a maioria deles mensuram, indiretamente, a taxa de viabilidade celular ou a integridade da membrana através de algum indicador, como a mudança de coloração (HOUGHTON *et al.*, 2007). Dentre estes ensaios está o teste de redução da resazurina, que é altamente estável. Trata-se de um corante atóxico solúvel em água que quantifica a viabilidade celular. Sua forma oxidada (resazurina de coloração azul índigo) entra no citosol, onde é reduzida por enzimas mitocondriais a resorufina (de coloração rosa fluorescente). A mudança de coloração indica a mudança da viabilidade e metabolismo celular e é detectada por espectrofotometria em um leitor de ELISA (O'BRIEN *et al.*, 2000).

Dentre os diversos ensaios de genotoxicidade disponíveis está o teste de micronúcleo, sendo este um dos mais difundidos em genética toxicológica (BONASSI *et al.*, 2007). Este ensaio possui várias vantagens em relação aos demais, pois não necessita de células em metáfase e é considerado um procedimento rápido, sensível, preciso e barato (CARVALHO *et al.*, 2002). Este teste pode ser realizado *in vivo* ou *in vitro*, sendo que o sistema *in vitro* oferece a possibilidade de utilização de uma série de modelos celulares diferentes e

proporciona simplicidade na quantificação dos micronúcleos (ALBERTINI *et al.*, 2000; FENECH, 2000).

2- JUSTIFICATIVA

Diante da crescente degradação dos corpos d'águas pela emissão de efluentes de atividades residenciais, industriais e rurais contendo substâncias tóxicas que são potencialmente maléficas ao ecossistema, observa-se a necessidade da realização de biomonitoramento constante desses ambientes por testes que sejam rápidos e sensíveis.

3- OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo realizar o biomonitoramento da qualidade da água nos recursos hídricos afluentes do Rio Uberabinha localizados no perímetro urbano, industrial e rural da cidade de Uberlândia-MG, por meio da caracterização dos parâmetros físico-químicos e testes de citogenotoxicidade em organismos modelo.

4- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição físico-química da água dos recursos hídricos biomonitorados na presente pesquisa;
- Avaliar o potencial ecotoxicológico dos afluentes para os organismos vivos por meio de testes de citotoxicidade e genotoxicidade;
- Testar a correlação e interdependência dos parâmetros físico-químicos com os parâmetros bióticos diagnosticados na avaliação ecotoxicológica para a plena avaliação do ambiente aquático.

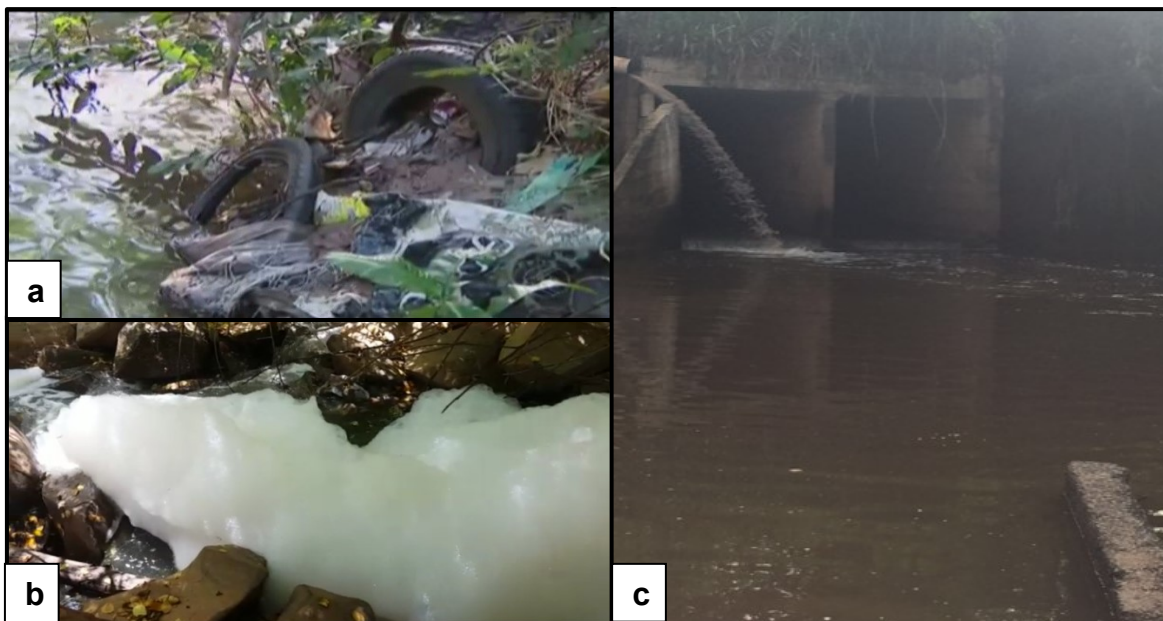
5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Locais de coleta

Os ensaios foram realizados de setembro de 2016 a maio de 2018. A avaliação da qualidade da água ocorreu em cinco afluentes do Rio Uberabinha, três deles pertencentes ao setor urbano/industrial da cidade de Uberlândia-MG: Córrego Liso (L), Córrego do Óleo (OL) e Córrego Lagoinha (LA). Os outros dois afluentes se localizam no setor rural de Uberlândia-MG: Córrego do Paula (C1) e Ribeirão Bom Jardim (C2). O Córrego Liso, por apresentar características de lançamento de efluentes industriais e ter histórico de forte impacto ambiental (PÉRES, 2005), foi

avaliado em 3 pontos, denominados L1, L2 e L3. O Córrego Lagoinha também possui grande influência antrópica e teve dois pontos estudados, LA1 e LA2. Algumas fotos foram tiradas em ambos os Córregos, Liso e Lagoinha, demonstrando a poluição encontrada nesses locais (Figura 5).

Figura 5. Fotos dos Córregos Liso e Lagoinha. a) Córrego Lagoinha no ponto LA2. b) Córrego Liso no ponto L2 c) Córrego Liso no ponto L3.



Fonte: Autoria própria.

Os dois afluentes localizados na área rural, C1 e C2 foram usados como locais de referência por estarem a montante da cidade e não receberem descarga de efluentes urbanos.

Os afluentes e pontos de coleta com suas localizações encontram-se especificados na Tabela 1 e Figura 6.

Tabela 1. Afluentes e pontos de coleta com coordenadas geográficas e especificações de localização.

Afluentes	Pontos	Coordenadas	Localizações
Córrego liso	L1	18°52'22.2"S 48°17'13.5"W	APP do Parque Victório Siquieroli
Córrego liso	L2	18°53'18.6"S 48°18'28.6"W	Intermediário – Bairro Maravilha
Córrego liso	L3	18°53'32.0"S 48°18'56.6"W	A jusante (confluência com Rio Uberabinha)

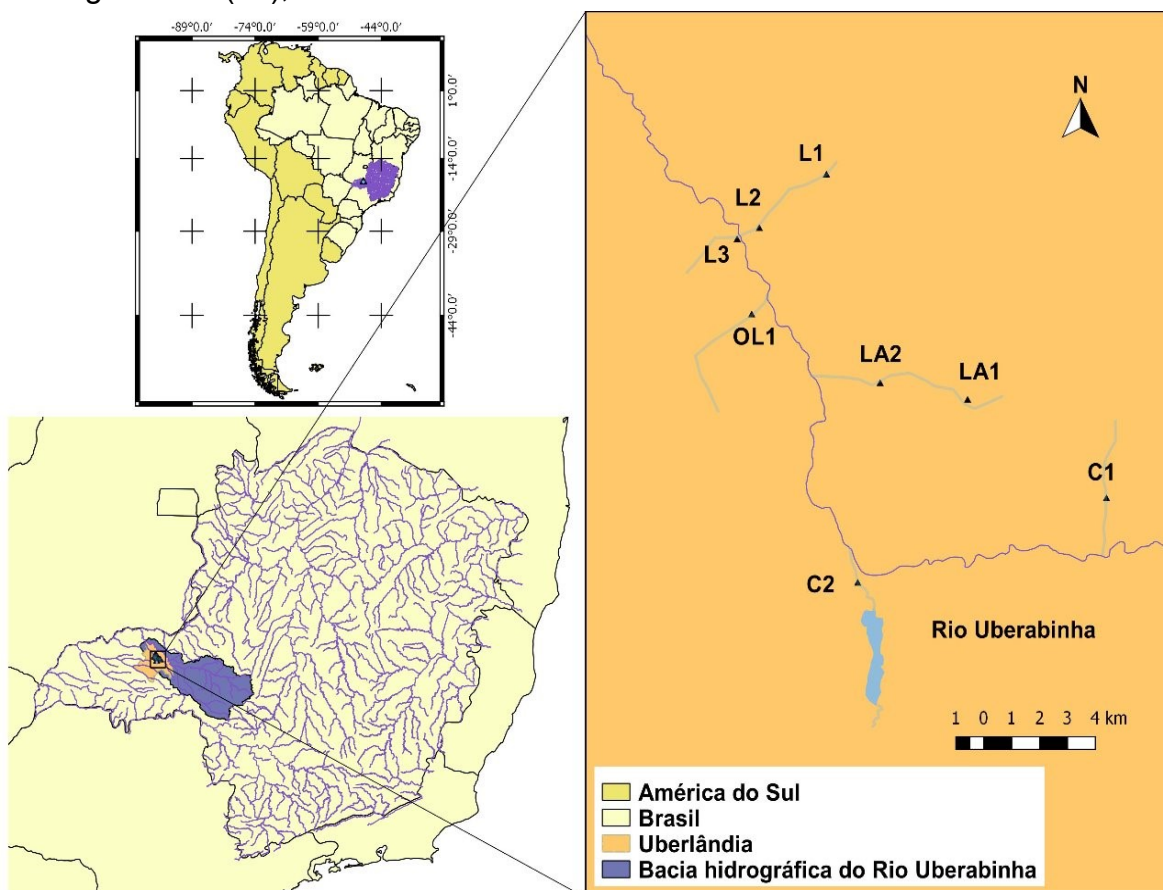
Córrego do Óleo	OL1	18°54'53.8"S 48°18'38.3"W	Parque Linear Córrego do óleo
Córrego Lagoinha	LA1	18°56'26.9"S 48°14'10.8"W	Parque Santa Luzia – próximo à nascente
Córrego Lagoinha	LA2	18°56'07.4"S 48°16'06.1"W	Parque linear Córrego Lagoinha – a jusante
Córrego do Paula	C1	18°58'14.0"S 48°11'19.9"W	A montante da cidade, na confluência
Ribeirão Bom Jardim	C2	18°59'50.3"S 48°16'22.7"W	Próximo à confluência com o Rio Uberabinha

Fonte: Autoria própria.

O Córrego Lagoinha, no seu ponto LA1, possui um represamento que se encontra dentro do Parque Santa Luzia, uma área de preservação permanente (APP), no local há muita fauna e flora, porém também existe muitos pontos de lançamento de resíduos urbanos neste local.

O ponto LA2 deste afluente se encontra entre os bairros Jardim Karaíba e Vigilato Pereira, também se localiza em uma APP dentro do Parque Linear Lagoinha, nesta área percebe-se um cuidado maior ao redor do córrego por parte da população, mas a água continua com indícios de poluição, pois nos bairros anteriores o cuidado com este recurso hídrico não é o mesmo.

Figura 6. Localizações dos pontos de coleta na Bacia do Rio Uberabinha. Córrego do Paula (C1); Ribeirão Bom Jardim (C2); Córrego Lagoinha 1 (LA1); Córrego Lagoinha 2 (LA2); Córrego do Óleo (OL1); Córrego Liso 1 (L1); Córrego Liso 2 (L2); Córrego Liso 3 (L3);



Fonte: Autoria própria.

No próximo afluente analisado, o Córrego do Óleo, o ponto de coleta OL1 se localiza entre os bairros Dona Zulmira e Jaraguá, um setor de extrema urbanização e que também não se encontra preservado.

O ponto L1 do Córrego Liso se localiza dentro do Parque Municipal Victorio Siquierolli, que possui uma área total de 232.300 metros quadrados, incluindo as áreas de preservação permanente (APP) dos Córregos Liso e Carvão (Prefeitura Municipal de Uberlândia, 2012). Este ponto encontra-se a montante da principal área de despejo de efluentes industriais, mas ainda sim possui algumas poluições que são visíveis, não se encontrando preservado da maneira ideal.

O próximo ponto deste afluente é o L2, localizado no bairro Maravilha, e recebe muitos despejos industriais em seu curso de água. O terceiro ponto do Córrego Liso, L3, fica na confluência deste afluente com o Rio Uberabinha, também

se localiza em um ponto de extrema influência de efluentes industriais e a poluição no local é nítida.

5.2. Coleta de água

A coleta de água para análise físico-química e realização dos bioensaios ocorreu entre os meses de novembro (2017) a abril (2018). As amostras de água foram coletadas nos cinco afluentes, como especificado na Tabela 1. A coleta foi realizada com o uso de frascos plásticos (5L) para as análises biológicas e vidros âmbar (1L) para os testes físico-químicos devidamente higienizados, sendo as preservações específicas realizadas para cada tipo de análise, conforme as necessidades (Figura 7).

Figura 7. Coleta de água na confluência do Córrego Liso com o Rio Uberabinha.



Fonte: Autoria própria.

Após a coleta das amostras de águas, os frascos foram imediatamente lacrados e refrigerados a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e assim transportadas para o laboratório de citogenética da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em conformidade com o protocolo da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2001) e os métodos padrões para análise de água e de águas residuais (APHA, 2005), mantendo-os sob refrigeração e protegidos da luz até o momento dos testes físico-químicos e biológicos.

5.3. Análise dos parâmetros físico-químicos dos recursos hídricos

Para obtenção dos parâmetros físico-químicos da água foram realizadas coletas de amostras de água nos afluentes para que estas fossem submetidas às análises. A análise seguiu os procedimentos de Boyd e Tucken (1992), dosando-se o Oxigênio Dissolvido, pH, Amônia não ionizada, taxa de Nitrito e Nitrato, alcalinidade, cor, turbidez, fluoreto, cloreto, surfactantes, sólidos totais dissolvidos, bário, metais pesado, Cloro, Cobre, Sódio, Manganês, Níquel, Crômio, Zinco.

Os parâmetros obtidos foram comparados com a normalidade aceita de acordo com a Resolução CONAMA N°357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Essa legislação sofreu alterações pelas resoluções n°370 de 2008, n°410 de 2009 e n°430 de 2011 e foi complementada pela Resolução n°393 de 2009 (Tabela 2). As análises foram feitas em triplicatas, das quais foram retiradas as médias com os desvios padrões.

Tabela 2. Padrões para corpos de água Classe 2.

Parâmetros	Valor máximo
Oxigênio dissolvido OD (mg/L)	Não inferior a 5 mg/L O ₂
Cloreto total	250 mg/L Cl
coliformes termotolerantes	1000/100mL
pH	6,0 a 9,0.
DBO 5 dias a 20°C;	até 5 mg/L O ₂
Nitrato	10,0 mg/L N
Fósforo total	0,1 mg/L P
Turbidez	até 100 UNT
Sólidos dissolvidos totais	500 mg/L
Nitrogênio amoniacal total	3,7mg/L N, para pH ≤ 7,5 2,0 mg/L N, para 7,5 < pH ≤ 8,0 1,0 mg/L N, para 8,0 < pH ≤ 8,5 0,5 mg/L N, para pH > 8,5
Arsênio total	0,01 mg/L As
Bário total	0,7 mg/L Ba
Chumbo total	0,01mg/L Pb
Cianeto livre	0,005 mg/L CN
Cobre dissolvido	0,009 mg/L Cu
Cromo total	0,05 mg/L Cr
Fenóis totais	0,003 mg/L C ₆ H ₅ OH
Mercúrio total	0,0002 mg/L Hg
Zinco total	0,18 mg/L Zn

Fonte: CONAMA N°357/2005

5.4. Cálculo do Índice de Qualidade de Água (IQA)

No Estado de Minas Gerais para indicar a qualidade das águas é utilizado o Índice de Qualidade das Águas (IQA) que foi desenvolvido pela *National Sanitation Foundation*, dos Estados Unidos. Ele é formado por um conjunto de nove

parâmetros considerados mais representativos para a caracterização da qualidade das águas: oxigênio dissolvido, coliformes termotolerantes, pH, demanda bioquímica de oxigênio, nitrato, fósforo total, variação da temperatura da água, turbidez e sólidos totais.

Os Índices de Qualidade de Água (IQA) destes cursos d'água foram determinados de acordo com os resultados obtidos com as análises dos parâmetros físico-químicos, seguindo a metodologia proposta pelo Instituto Mineiro de gestão de Águas (IGAM) (SEMAD, 2004). Os cálculos são analisados usando o software IQADATA e os dados fornecidos são classificados conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação dos Índices de Qualidade de Água (IQA).

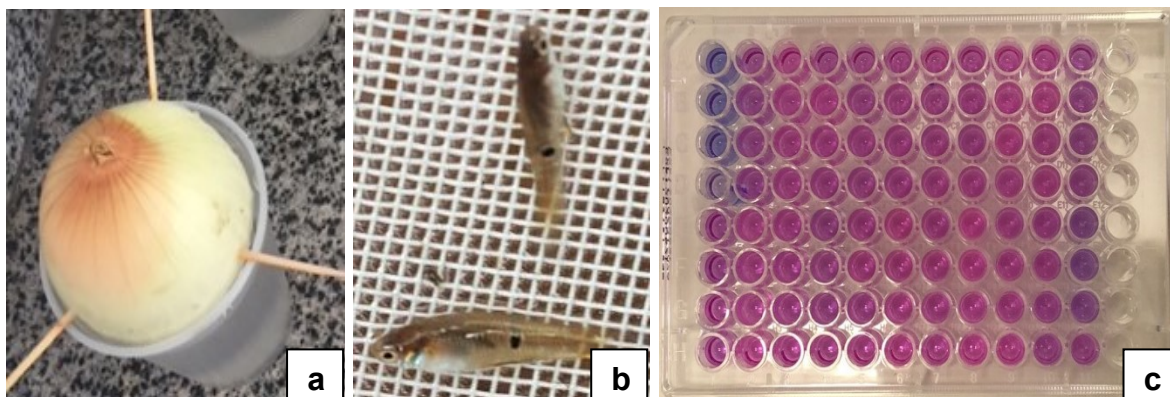
Nível de qualidade	Faixa
Excelente	$90 < IQA \leq 100$
Bom	$70 < IQA \leq 90$
Regular	$50 < IQA \leq 70$
Ruim	$25 < IQA \leq 50$
Muito ruim	$0 < IQA \leq 25$

Fonte: SEMAD 2004.

5.5. Bioensaios *In vivo*

As análises biológicas realizadas no presente estudo utilizaram modelos bioindicadores de toxicidade para obtenção de respostas acerca das condições em que estes ambientes se encontram. Estes modelos são capazes de mensurar a qualidade ambiental através da exposição a estímulos externos. Os bioensaios foram realizados utilizando os seguintes organismos modelos bioindicadores de toxicidade: a) *Allium cepa* b) *Poecilia reticulata* c) Cultura de célula C2C12 (Figura 8). Estes organismos foram submetidos aos testes de citotoxicidade e/ou genotoxicidade como descrito na tabela 2.

Figura 8: Organismos utilizados como bioindicadores de toxicidade nos afluentes do Rio Uberabinha. a) *Allium cepa* (cebola) b) *Poecilia reticulata* c) Cultura de célula C2C12.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4. Testes citogenotóxicos realizados com cada organismo modelo.

Organismos bioindicadores	Citotoxicidade	Genotoxicidade
<i>Allium cepa</i> (cebola)	Tamanho das Raízes e Índice Mitótico	Aberrações cromossômicas e Micronúcleo
<i>Poecilia reticulata</i> (peixe)	-	Micronúcleo
Cultura de Células C2C12	Viabilidade Celular	Micronúcleo

Fonte: Autoria própria

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Citogenética-Bloco 4N da Universidade Federal de Uberlândia.

5.5.1. *Allium cepa* (cebola)

O protocolo seguido para o bioensaio com *Allium cepa* (cebola) foi o estabelecido por Fiskesjö (1985) com algumas modificações. Os bulbos utilizados no teste foram adquiridos na Central de abastecimento (CEASA) da cidade de Uberlândia-MG, essas possuíam tamanhos médios uniformes, não eram germinadas e se encontravam saudáveis. Para a realização do teste foram utilizados 5 bulbos de *A. cepa* para cada tratamento (3 afluentes com um total de 5 pontos) e suas diluições e também para os controles negativo (água destilada) e

positivo (paracetamol 400 mg/L) . As diluições realizadas foram de 25%, 50% e 100% (Tabela 2).

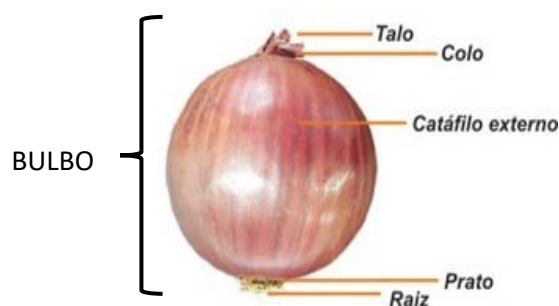
Tabela 5: Quantidade de Bulbos de *Allium cepa* utilizados para cada diluição e para os controles positivo e negativo.

Pontos	Diluições			Total de Bulbos
	25%	50%	100%	
Controle Negativo	5	5	5	15
Controle Positivo	5	5	5	15
Córrego Lagoinha (L2)	5	5	5	15
Córrego do Óleo (OL1)	5	5	5	15
Córrego Liso (L1)	5	5	5	15
Córrego Liso (L2)	5	5	5	15
Córrego Liso (L3)	5	5	5	15

Fonte: Autoria própria.

Para a exposição de *A. cepa* ao teste é necessário que se faça a preparação do bulbo, limpando e raspando sua parte inferior, região de crescimento das raízes chamada prato, para que haja o surgimento das gemas radiculares (Figura 9).

Figura 9. Estruturas dos Bulbos de *Allium cepa* (cebola).



Fonte: <http://www.fae.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/hortalicas/cebola.htm>

Em seguida os bulbos são estaqueados em recipientes com as gemas radiculares entrando em contato com água destilada por 24 horas a temperatura ambiente e iluminação baixa, para que assim ocorra o desenvolvimento do meristema radicular (Figura 10).

Figura 10. Exposição de *A. cepa* ao bioensaio de citogenotoxicidade.



Fonte: Autoria própria.

Após este período, os bulbos foram colocados em contato com as soluções-teste e com os controles negativo e positivo por um período de 72 horas.

Consequente ao período de exposição, os bulbos de cebola foram retirados das soluções teste e as 10 maiores raízes de cada bulbo foram cortadas com estilete e medidas com auxílio de paquímetro digital para posterior análise. Essas raízes obtidas foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético) por 24 horas à temperatura ambiente e armazenadas em etanol 70% a 4°C para posterior preparo de lâminas para análise.

O preparo das lâminas foi realizado segundo a metodologia de GUERRA (2002) com adaptações. Primeiramente as raízes retiradas do etanol 70% foram lavadas três vezes em água destilada, 5 minutos cada lavagem, em seguida hidrolisadas em HCl 5N à temperatura ambiente por 3 minutos e lavadas novamente duas vezes em água destilada. Depois de lavada, o meristema da raiz foi transferido para a lâmina e uma gota de ácido acético a 45% foi pingada sobre a lamina para evitar ressecamento das raízes. Com o auxílio de um estereoscópio a coifa foi retirada procurando deixar apenas o meristema, que será fragmentado em pedaços pequenos.

Posteriormente, uma gota de ácido acético é pingada novamente na lâmina sobre o material para que esta seja coberta com lamínula. Para que o material não fique sobreposto é feito um esmagamento com o dedo polegar sobre a o conjunto

lâmina/lamínula. Após a preparação da lâmina, a lamínula foi retirada em nitrogênio líquido e seca ao ar (Figura 11).

Figura 11. Etapas da confecção das lâminas. a) raízes armazenadas em etanol 70%; b) preparação das lâminas; c) retirada da lâmina após nitrogênio líquido.



Fonte: Autoria própria.

As lâminas foram coradas com fluorocromo Hoechst (33258) por 20 minutos no escuro.

Para cada bulbo foi preparada uma lâmina, contendo pelo menos duas raízes. Para as análises, as lâminas foram codificadas e examinadas pela mesma pessoa utilizando um microscópio de fluorescência com objetiva de 40x. Foram analisadas 1000 células por repetição, totalizando 5000 células para cada tratamento.

A partir dos dados obtidos pode-se averiguar o efeito citotóxico e genotóxico. Os efeitos citotóxicos foram mensurados a partir da medição das raízes utilizando um paquímetro após a exposição aos tratamentos e também através do Índice Mitótico no experimento que foi calculado pela razão do número de células em divisão pelo número total de células analisadas, multiplicado por 100, como representado na fórmula abaixo:

$$IM = N^{\circ} \text{ cm} / N^{\circ} \text{ct} \times 100$$

Onde:

$N^{\circ} \text{ cm}$ representa o número de células em divisão mitótica;

$N^{\circ} \text{ct}$ o número de células totais.

Já o efeito genotóxico é estimado através da frequência de micronúcleos em 1.000 células na interfase por bulbo e o número de anormalidades cromossômicas (cromossomos retardatários, pontes cromossômicas e fragmentos) em 100 anáfases-telófases. Algumas anormalidades cromossômicas estão representadas na figura 12.

As aberrações cromossômicas (AC) foram apresentadas como um número total de aberrações em 100 células em divisão (excluindo a prófase) por cebola. Foram consideradas anormalidades cromossômicas: fragmentos cromossômicos, cromossomos atrasados e pontes.

Cada tratamento foi comparado com o controle negativo (água destilada) e a ocorrência de toxicidade (inibição do crescimento) foi considerada quando a diferença entre tratamento e controle negativo for estatisticamente significativa. Como teste estatístico para cálculo foi utilizado o teste ANOVA.

Figura 12. Micronúcleos e dois exemplos de anormalidades cromossômicas observadas nas células meristemáticas radiculares de *A. cepa*: (a) Micronúcleos; (b) Cromossomos perdidos em anáfase; (c) pontes anafásicas.



Fonte: (PATHIRATNE; et al, 2015)

5.5.2. *Poecilia reticulata* (peixe)

O ensaio *in vivo* utilizando peixes foi realizado com a espécie *Poecilia reticulata*, sob ciência da Comissão de Ética na Utilização de Animais pelo protocolo 119/17.

Para a captura dos espécimes foram utilizadas redes de mão, sendo capturados 7 exemplares machos adultos da espécie em cada um dos pontos, sendo eles: Pontos controles Córrego do Paula (Ponto C1), Ribeirão Bom Jardim (Ponto C2), e os afluentes urbanos, Córrego Lagoinha (Pontos LA1 e LA2), Córrego

do Óleo (OL1) e para finalizar o Córrego Liso (Pontos L1, L2 e L3). Os pontos de coleta estão detalhados na Figura 7 e Tabela 1.

Os bioensaios seguiram o protocolo de Pereira e De Campos Junior (2015). A eutanásia dos peixes foi por imersão em solução de benzocaína (190mg/L de água) conforme consta no projeto 119/17 do CEUA.

O material biológico usado para os testes foi o sangue, de onde se tem os eritrócitos que são analisados para quantificar os micronúcleos e assim poder mensurar a genotoxicidade do local onde esse peixe vive.

Os eritrócitos para análises foram obtidos das brânquias do peixe, sendo que para isso estas foram centrifugadas em soro fetal bovino (800 x por 5 minutos), desta forma o sobrenadante é descartado e o pellet que fica no fundo do recipiente contém as células de eritrócitos que são utilizadas para montar as lâminas.

Para análise microscópica de cada um dos peixes foram preparadas três lâminas com esfregaço dos eritrócitos. As lâminas foram coradas com Giemsa (5%) e foram contados 2.000 eritrócitos por lâmina, totalizando 6.000 células por peixe. Por meio de um fotomicroscópio (magnificação de 1000 x), foram identificadas as frequências de anormalidades nucleares (AN) e de micronúcleos (MN).

5.6. Bioensaios *In vitro*

Cultura de células C2C12

Manutenção das linhagens celulares

A linhagem celular de Miócito C2C12 foi mantida *in vitro*, cultivadas em frascos de 25 cm² em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK), suplementado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab, Campinas, Brazil). As células foram cultivadas em uma estufa a 37°C e 5% CO₂.

Avaliação da atividade citotóxica do CuDoxPhen pelo teste de redução da resazurina

Para a realização do ensaio de viabilidade celular utilizando o teste de redução da resazurina a linhagem celular de miócitos C2C12 (2×10^4 células/poço) foi incubada em meio de cultura RPMI-1640 completo e adicionadas a uma microplaca estéril de 96 poços transparentes. O meio de cultura foi preparado com

água oriunda dos pontos estudados esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

Os tratamentos consistiram na incubação das células em meio completo preparado com a água oriunda dos pontos estudados nas concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% e quando necessário utilizou-se água destilada para completar a diluição. A microplaca foi incubada a 37°C com 5% de CO₂, por 24 horas. Na sequência, foram adicionados em cada poço da microplaca 15 µL do agente revelador resazurina 10%, procedendo à leitura após 4 a 6 horas de incubação. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. A leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro a 570 e 600 nm.

De acordo com Bénéré *et al.*, (2007), a porcentagem de viabilidade celular obtida pelo teste de Alamar Blue é dada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = [(O2 \times A1) - (O1 \times A2)] / [(O2 \times P1) - (O1 \times P2)] \times 100$$

Em que:

O1 = coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 570nm (pré-determinado em 117216);

O2 = valor de coeficiente de extinção molar (E) de Alamar Blue oxidado a 600nm (pré-determinado em 80586);

A1 = absorbância das células tratadas com CuDoxPhen à 570nm;

A2 = absorbância das células tratadas com CuDoxPhen à 600nm;

P1 = valores de absorbância do controle de viabilidade à 570nm;

P2 = valores de absorbância do controle de viabilidade à 600nm.

Avaliação da genotoxicidade pelo Teste do Micronúcleo *in vitro*

As análises de genotoxicidade foram realizadas pelo teste de micronúcleo *in vitro* acompanhando o protocolo OECD 487, com algumas modificações. As células cuja citotoxicidade foram testadas pelo método de redução da resazurina foram utilizadas para a realização do teste do micronúcleo. Para este ensaio foram escolhidas as concentrações de 100%, 50% e 25% da água dos pontos estudados. Foi mantido um controle negativo que recebeu meio completo preparado apenas com água destilada e dois controle positivo aos quais foram adicionadas drogas com comprovada atividade genotóxica (Mitomicina-C a uma concentração de 50µg/mL e colchicina a uma concentração de 10 µg/mL).

Além do tratamento de 24h, as células foram cultivadas por mais 24h na presença de citocalasina b com o intuito de bloquear a citocinese e permitir a identificação das células que completaram uma divisão nuclear após o tratamento e tinham a aparência binucleada, as quais foram utilizadas para a contagem de micronúcleos.

Após esse período as células foram fixadas em PBS/formol 10%, coradas com o fluorocromo Hoechst 33258 e analisadas em microscópio invertido de fluorescência Evos (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Foi contado um valor mínimo de 2000 células binucleadas por concentração e apenas os micronúcleos presentes em células binucleadas foram considerados na determinação da frequência de micronúcleos.

5.7. Análises estatísticas

Nos ensaios de citotoxicidade, a IC₅₀ (concentração que inibe 50 % do crescimento celular em relação ao controle) foi determinada utilizando o programa GraphPad Prism 7.0, a partir de uma regressão não linear, onde se relacionou o percentual de viabilidade celular em função do logaritmo das concentrações testadas, admitindo-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Por fim, foram plotados gráficos expressos como média \pm erro padrão da média. Tanto os gráficos quanto as análises estatísticas foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 7.0.

O teste de micronúcleos em *Poecilia reticulata* foi analisado estatisticamente por análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnetts. Os demais ensaios foram analisados por two-way ANOVA, também seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Todos os tratamentos foram comparados com o controle negativo. O cálculo da viabilidade celular no teste de citotoxicidade em cultura de células foi feito a partir de uma regressão não linear, que relaciona o percentual de viabilidade celular em função do logaritmo das diferentes concentrações de água testadas. Todos os testes admitiram um intervalo de confiança de no mínimo 95% de confiabilidade ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Parâmetros físico-químicos dos recursos hídricos

Os resultados da análise dos parâmetros físico-químicos estão representados na tabela 6. Os valores destacados em vermelho são aqueles que estão acima do limite permitido na Resolução CONAMA 357/2005 e em azul aqueles que estão abaixo do limite permitido.

O parâmetro Oxigênio Dissolvido (OD) foi o único que apresentou valores abaixo dos permitidos nos pontos LA1, L1 e L3 apenas. O OD é um componente essencial para os organismos aeróbicos presentes na água, os quais geralmente não resistem à concentrações inferiores à 4mg/L. Um decréscimo no OD da água pode ocorrer devido a eutrofização do corpo hídrico. A eutrofização é causada principalmente pelo despejo de matéria orgânica nos cursos de água, que podem ser advindos de esgoto doméstico, fertilizantes agrícolas e efluentes industriais. Os pontos que apresentaram esse decréscimo de OD se localizam em setor altamente urbano (LA1) e industrial (L1 e L3), tendo possivelmente recebido esgotos sem o devido tratamento, o que pode ser o motivo dessa problemática (PARRON, L. M. et al. 2011).

O fósforo total é, em razão da sua baixa disponibilidade em regiões de clima tropical, o nutriente mais importante para o crescimento de plantas aquáticas. Quando o fósforo está em excesso o crescimento das plantas aumenta, prejudicando os usos da água. O fósforo quando está em excesso também está relacionado ao fenômeno de eutrofização, pois se trata de um nutriente em altos níveis que interfere na biota, fazendo, principalmente, com que a população de bactérias se eleve e consuma o oxigênio disponível na água. No ponto LA1 foi observado um aumento na quantidade de fósforo total, que assim como no parâmetro de Oxigênio Dissolvido, está vinculado com os despejos de esgotos domésticos e industriais (BRASIL, 2014).

Os coliformes fecais foram encontrados em desconformidade apenas no ponto L3 do Córrego Liso, onde apresentou um valor de 1016.33 NMP/100mL. Essa avaliação microbiológica da água tem um papel destacado, visto que uma grande variedade de microrganismos patogênicos, em sua maioria de origem fecal, podem ser veículos de doenças. A falta de saneamento básico é um dos principais motivos para a contaminação de afluentes por coliformes fecais (BETTEGA, 2006). No ponto L3 há grandes indícios de lançamentos de esgotos clandestinos tanto

domésticos como industriais, o que pode estar ocasionando este resultado alto para coliformes fecais.

Apenas os Controles C1 (Córrego do Paula) e C2 (Ribeirão Bom jardim) apresentaram valores abaixo do permitido para a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e para os Sólidos Totais Dissolvidos. O parâmetro de DBO é utilizado para identificar a presença de matéria orgânica, o que é mensurado pelo consumo de oxigênio pelos organismos vivos (VON SPERLING, M., 2005). Já os Sólidos Dissolvidos, que é a somatória de todos os constituintes químicos dissolvidos nas águas, são mensurados em função da qualidade estética da água potável e também por serem indicadores agregados da presença de produtos químicos contaminantes (PARRON, L. M. et al. 2011). Esses números de DBO e Sólidos Totais Dissolvidos acima dos valores indicados para uma água de boa qualidade estão, na maioria das vezes, relacionados ao lançamento de esgotos domésticos e industriais, o que ocorre nos seis pontos de estudo que apresentaram valores mais altos.

A turbidez da água nos pontos LA1, OL1, L1, L2 e L3 estava acima do desejável. De acordo com Von Sperling (2005) elevados valores de Turbidez podem estar relacionados a fatores naturais como partículas de rocha, algas e/ou fatores antropogênicos como despejos domésticos, industriais ou erosão, estes últimos fatores podem estar associados a compostos tóxicos e organismos patogênicos, o que pode colocar em risco a saúde dos seres vivos que habitam esses locais.

De acordo com o manual da FUNASA (2014), o parâmetro Nitrogênio Amoniacal tem uma significativa origem antropogênica, principalmente em decorrência do lançamento em corpos d'água de despejos domésticos, industriais e de criatórios de animais, assim como de fertilizantes. Nos pontos LA1, OL1, L1, L2 e L3 também houve um nível maior desse parâmetro, o que indica mais uma vez a influência dos esgotos domésticos e industriais na qualidade da água nesses afluentes.

Os pontos OL1, L1, L2 e L3 apresentaram valores acima dos permitidos para os metais pesados Cádmio e Chumbo, sendo o L3 o local com maior incidência destes metais. Dentre as várias formas de contaminação do meio ambiente, a contaminação da água por metais pesados tem sido uma das formas que tem

trazido maior preocupação aos pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle de poluição, principalmente devido ao seu alto potencial de toxicidade tanto para os organismos aquáticos quanto para o homem (ZEMAN et al., 2006).

Tanto o Cádmio quanto o Chumbo, são metais pesados classificados dentro dos mais perigosos poluentes ambientais, que rapidamente se bioacumulam em sistemas biológicos de diferentes tipos de ambientes, incluindo os ambientes aquáticos. Esses metais são emitidos no meio ambiente em decorrência do aumento da industrialização e de outras atividades antropogênicas. Com a persistência desses metais nos ecossistemas, inúmeros efeitos adversos deletérios podem ocorrer, afetando tanto a vida selvagem (causando desequilíbrios ecológicos), quanto os seres humanos (gerando doenças importantes, como o câncer) (ALIMBA *et al.*, 2018).

O Cádmio e o Chumbo estão vinculados ao padrão de emissão de esgotos e é uma problemática no âmbito de saúde pública, tendo em vista que a toxicidade desses elementos pode afetar não apenas os segmentos da biota aquática, mas de forma direta ou indireta os seres humanos, através do consumo dessa água ou da ingestão de peixes contaminados.

Nos organismos aquáticos os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades. Esses compostos tóxicos podem ser retidos nos organismos e provocar efeitos deletérios quando níveis elevados são atingidos resultantes de um processo chamado biomagnificação (COSTA, et al., 2008).

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos dos pontos de estudo. Córrego do Paula (C1); Ribeirão Bom Jardim (C2); Córrego Lagoinha 1(LA1); Córrego Lagoinha 2(LA2); Córrego do Óleo 1 (OL1); Córrego Liso 1(L1); Córrego Liso 2(L2); Córrego Liso 3(L3); Os dados representam a média \pm o erro padrão de 3 replicatas.

Parâmetros	Unid.	Pontos de Estudo (Média \pm SD)							
		C1	C2	LA1	LA2	OL1	L1	L2	L3
OD	(mg/L)	7.53 \pm 0.12	7.17 \pm 0.06	3.00. \pm 0.17*	5.33 \pm 0.15	4.93 \pm 0.21	3.47 \pm 0.15*	5.03 \pm 0.06	3.03 \pm 0.15*
Cloretos	(mg/L)	1.03 \pm 0.17	1.86 \pm 0.10	12.24 \pm 0.32	11.40 \pm 0.28	9.45 \pm 0.34	10.04 \pm 0.29	9.74 \pm 0.15	10.98 \pm 0.24
Col. fecais	(NMP)	11.67 \pm 4.93	24.0 \pm 6.24	417.33 \pm 35.25	581.33 \pm 98.19	752 \pm 117.69	787,67 \pm 79.21	605.00 \pm 117.15	1016.33 \pm 112.86*
pH	UpH	6.77 \pm 0.06	6.77 \pm 0.06	6.43 \pm 0.15	6.47 \pm 0.15	6.17 \pm 0.06	6.17 \pm 0.12	6.27 \pm 0.06	5.97 \pm 0.06
DBO	(mg/L)	1.43 \pm 0.06	1.17 \pm 0.21	10.77 \pm 2.27*	7.53 \pm 0.47*	6.93 \pm 0.31*	9.70 \pm 0.53*	7.07 \pm 0.65*	9.53 \pm 0.65*
Nitratos	(mg/L)	0.53 \pm 0.09	0.45 \pm 0.07	3.52 \pm 0.15	3.00 \pm 0.12	3.54 \pm 0.11	4.56 \pm 0.12	4.42 \pm 0.08	4.51 \pm 0.24
Nitritos	(mg/L)	ND	ND	0.04 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0,05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
Fósforo T.	(mg/L)	ND	ND	0.12 \pm 0.01*	0.03 \pm 0.0	0,05 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01
Turbidez	(UNT)	3.90 \pm 0.26	5.37 \pm 0.15	113.40 \pm 3.67*	97.77 \pm 1.42	117.97 \pm 4.15*	141.43 \pm 2.85*	108.77 \pm 2.18*	150.63 \pm 1.91*
Sólidos T.	(mg/L)	52.53 \pm 11.49	51.27 \pm 7.78	572.53 \pm 98.45*	586.47 \pm 112.97*	499.63 \pm 64.70*	719.87 \pm 62.00*	524.80 \pm 46.48*	943.07 \pm 106.68*
N.Amon.	(mg/L)	0.65 \pm 0.08	0.57 \pm 0.11	3.94 \pm 0.06*	3.50 \pm 0.08	4.55 \pm 0.07*	4.77 \pm 0.06*	4.87 \pm 0.13*	5.56 \pm 0.23*

Fonte: Autoria própria ND: Não detectado. Valores em desconformidade com o nível permitido, conforme determinado pelo CONAMA (Resolução 357/2005 - Classe 2).

Cont. Tabela 6. Parâmetros físico-químicos de todos os pontos de estudo. Córrego do Paula (C1); Ribeirão Bom Jardim (C2); Córrego Lagoinha 1 (LA1); Córrego Lagoinha 2 (LA2); Córrego do Óleo 1 (OL1); Córrego Liso 1 (L1); Córrego Liso 2 (L2); Córrego Liso 3 (L3); Os dados representam a média \pm o erro padrão de 3 replicatas.

Parâmetros	Unid	C1	C2	LA1	LA2	OL1	L1	L2	L3
Arsênio	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bário	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cádmio	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	0.04 \pm 0.00*	0.04 \pm 0.00*	0.05 \pm 0.00*	0.11 \pm 0.02*
Chumbo	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	0.01 \pm 0.00*	0.05 \pm 0.01*	0.05 \pm 0.00*	0.06 \pm 0.00*
Cianeto	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cobre	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cromo	(mg/L)	ND	ND	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.0	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00
Fenólicos totais	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mercúrio	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zinco	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Fonte: Autoria própria ND: Não detectado. Valores em desconformidade com o nível permitido, conforme determinado pelo CONAMA (Resolução 357/2005 - Classe 2).

Vários autores (COOGAN; BARE; WAALKES, 1992; LIN *et al.*, 1994; MONTEIRO *et al.*, 2007) descrevem o Cadmio (Cd) e o Chumbo (Pb) como potentes agentes genotóxicos em diversos modelos biológicos. Karri *et al.* (2017) em seu trabalho realizou uma avaliação comparativa da Toxicidade In Vitro de alguns metais pesados, dentre eles o Chumbo e Cádmiu, e constatou que ambos metais pesados são causadores de danos na molécula de DNA e que possuem uma genotoxicidade de potencial similar.

6.2. Índice de Qualidade de Água (IQA)

Os dados obtidos na análise físico-química das amostras de água dos oito pontos do presente estudo foram interpretados com a utilização do software IQADData. Os resultados obtidos classificam o nível de qualidade da água em excelente, bom, regular, ruim, muito ruim. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 7 e Figura 13.

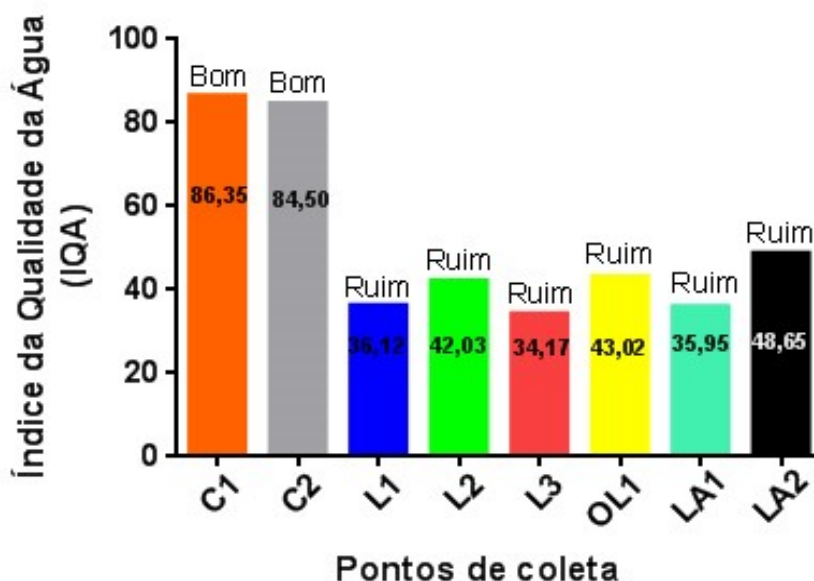
Tabela 7. Tabela com valores de IQA para as análises de água dos pontos de coleta.

Afluentes	Pontos	IQA	Nível de Qualidade
Ribeirão Bom Jardim	C2	84,50	BOM
Córrego do Paula	C1	86,35	BOM
Córrego Lagoinha	LA1	35,95	RUIM
Córrego Lagoinha	LA2	48,65	RUIM
Córrego do Óleo	OL1	43,02	RUIM
Córrego liso	L1	36,12	RUIM
Córrego liso	L2	42,03	RUIM
Córrego liso	L3	34,17	RUIM

Fonte: Autoria própria com dados obtidos no software IQADData.

O IQA pode ser utilizado para refletir a interferência de esgotos domésticos e outros materiais orgânicos, nutrientes e sólidos na qualidade da água. A partir dos resultados encontrados em relação a esse índice que mede a qualidade da água pôde-se aferir que os afluentes LA1, LA2, OL1, L1, L2 e L3, que apresentaram um IQA de nível RUIM estão tendo fortes interferências dos efluentes lançados nesses corpos hídricos.

Figura 13. Representação gráfica da classificação do nível de qualidade da água em excelente, bom, regular, ruim, muito ruim.



Fonte: Software IQADData

Já os afluentes C1 e C2 foram qualificados como tendo um nível de qualidade da água BOM, isso se deve ao fato destes recursos hídricos estarem na área rural, não recebendo assim despejos de contaminantes pelos esgotos.

6.3. Bioensaios *in vivo*

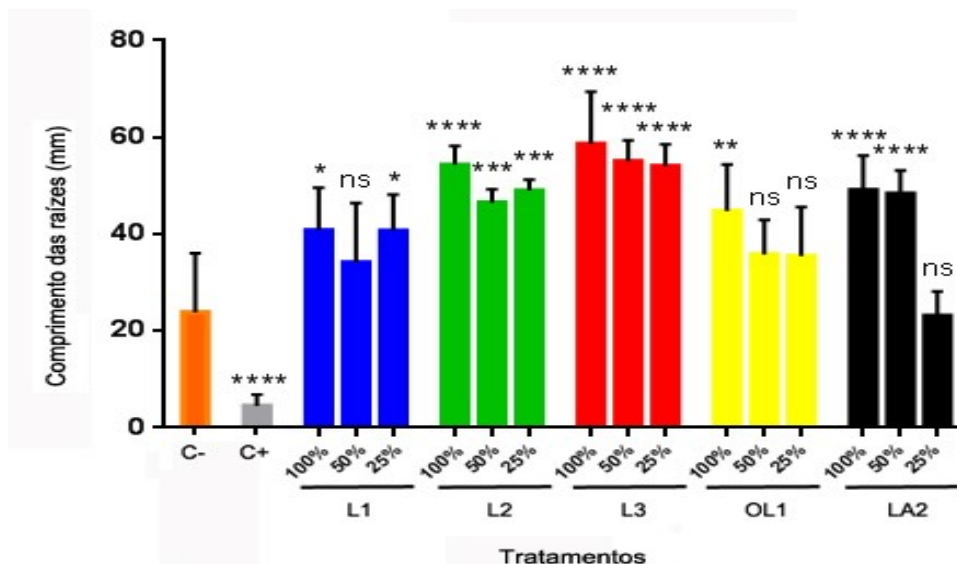
6.3.1. *Allium cepa*

Nos resultados obtidos para *A. cepa* cada tratamento foi comparado com o controle negativo (água destilada) e a ocorrência de toxicidade (inibição do crescimento, taxa de micronúcleo e taxa de aberrações cromossômicas) foi considerada quando a diferença entre tratamento e controle negativo foi estatisticamente significativa.

Toxicidade

Para avaliação da toxicidade entre os afluentes foram realizadas análises estatísticas comparando as médias de comprimento de raízes de *Allium cepa* após a exposição aos tratamentos. O crescimento das raízes em diferentes concentrações de tratamento foram comparados com o controle. A partir dos resultados obtidos foi gerado o gráfico abaixo (Figura 14).

Figura 14. Gráfico de comprimento de raízes de *Allium cepa* tratadas com água dos diferentes afluentes e com os controles negativo (C- água destilada) e positivo (C+ paracetamol). Os dados representam a média \pm o erro padrão. NS: não significativo ($P > 0,05$). Significativos: $p < 0,05$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).



Fonte: Autoria própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo ($P > 0,05$).

Os resultados representados no gráfico apontam para uma não toxicidade dos afluentes testados em relação ao crescimento radicular de *Allium cepa*. Quando é feita uma comparação entre o controle positivo (C+) e o negativo (C-) observa-se que o comprimento das raízes do C- foi bem maior que o do C+, diferindo estatisticamente deste, o que demonstra que o C+ foi capaz de diminuir o crescimento radicular das cebolas, apresentando assim toxicidade para as raízes.

Porém quando se compara o C- com os demais afluentes o efeito é contrário, pois todos os afluentes demonstram tamanhos maiores das raízes que o próprio C-. O aumento no crescimento radicular das raízes expostas aos afluentes em relação àquelas expostas apenas à água destilada (C+) pode ser justificado devido ao fato de nesses cursos de água haver uma maior concentração de resíduos orgânicos advindos de despejo de esgotos domésticos e industriais. A presença dessa matéria orgânica fornece nutrientes para as radículas e assim elas têm um maior crescimento (FERREIRA, 2012).

Quando são feitas comparações do crescimento das raízes entre as diluições de 100%, 50% e 25% do mesmo afluente os resultados mostram que as

diluições de 100% sempre possuem os maiores tamanhos de raízes comparado com as diluições de 50% e 25%. Esse fato se constatou no Córrego Lagoinha, no Córrego do Óleo e também no Córrego liso, ou seja, em todos os afluentes há um gradiente de crescimento radicular relacionado às diluições desses afluentes, sendo que as diluições mais concentradas provocam maior crescimento e as menos concentradas provocam menor crescimento.

Dessa maneira o afluente não se demonstrou tóxico para o crescimento das raízes e sim potencializou o crescimento destas. Esse é mais um indício de que a presença da matéria orgânica realmente estimula o crescimento dessas raízes, sendo que quanto mais concentrada estiver a diluição do afluente, maior serão os valores dos comprimentos das raízes, pois haverá nestes maior quantidade de matéria orgânica.

Citotoxicidade

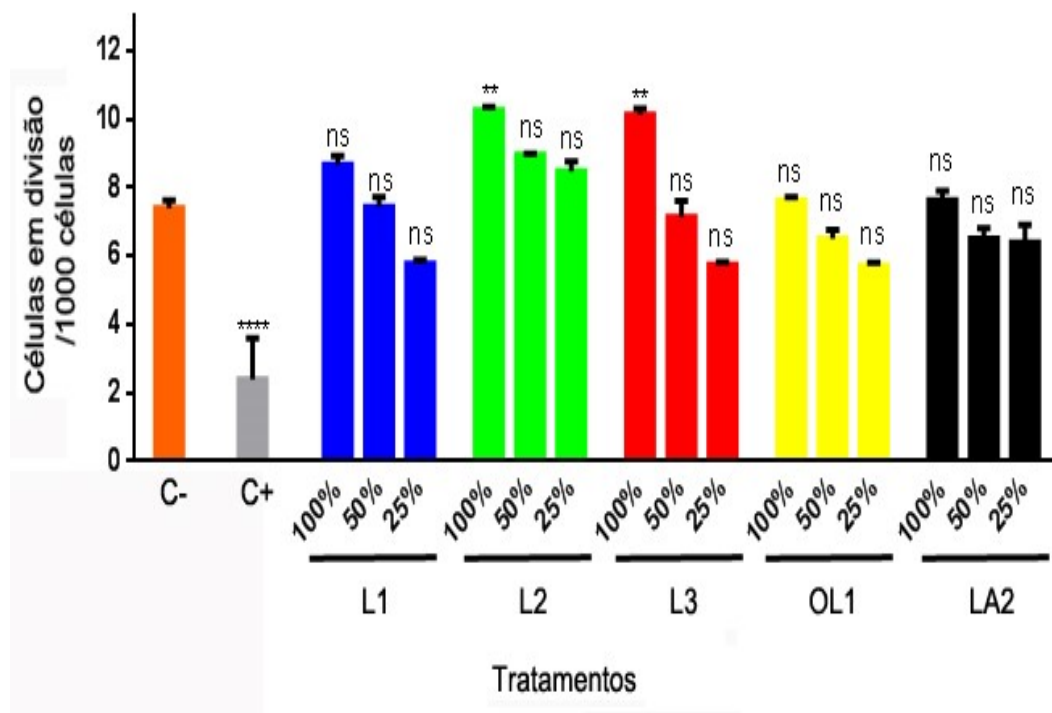
Outro teste realizado neste estudo avalia a citotoxicidade a partir do Índice Mitótico (IM) das células de *A. cepa*. O IM indica a porcentagem de células que estão em processo de divisão celular e a partir dos valores gerados são feitas análises estatísticas comparativas que relacionam o IM de cada tratamento, podendo assim mensurar a citotoxicidade desses tratamentos quando comparados com a normalidade (Controle Negativo). Na figura 15 o gráfico expõe esses resultados comparativos gerados pela análise estatística.

Os dados da figura 15 demonstram a não citotoxicidade dos afluentes para as células de *Allium cepa*. A citotoxicidade é evidenciada quando ocorre um efeito mito-depressivo, ou seja, a taxa de células em mitose diminui em comparação com o controle negativo, levando a um baixo IM. Um exemplo é o que acontece com o controle positivo desse experimento, quando o seu IM é comparado com o IM do controle negativo observa-se um decréscimo no IM do controle positivo com significância estatística, desta maneira o controle positivo é visto como citotóxico.

Nos resultados obtidos nessa avaliação a comparação entre os IMs dos afluentes com o IM do Controle negativo, em sua maioria, apresentaram valores não significativos em quase todas as comparações. Apenas os pontos L2 100% e L3 100% apresentaram o Índice Mitótico maior que no controle negativo, sugerindo

que nesses pontos haja muita deposição de matéria orgânica por esgotos domésticos, levando a uma maior proliferação celular (FERREIRA, 2012).

Figura 15. Gráfico representativo do Índice Mitótico encontrado nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. NS: Não Significativo ($P > 0,05$). Significativo: * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).



Fonte: Autoria própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo ($P > 0,05$).

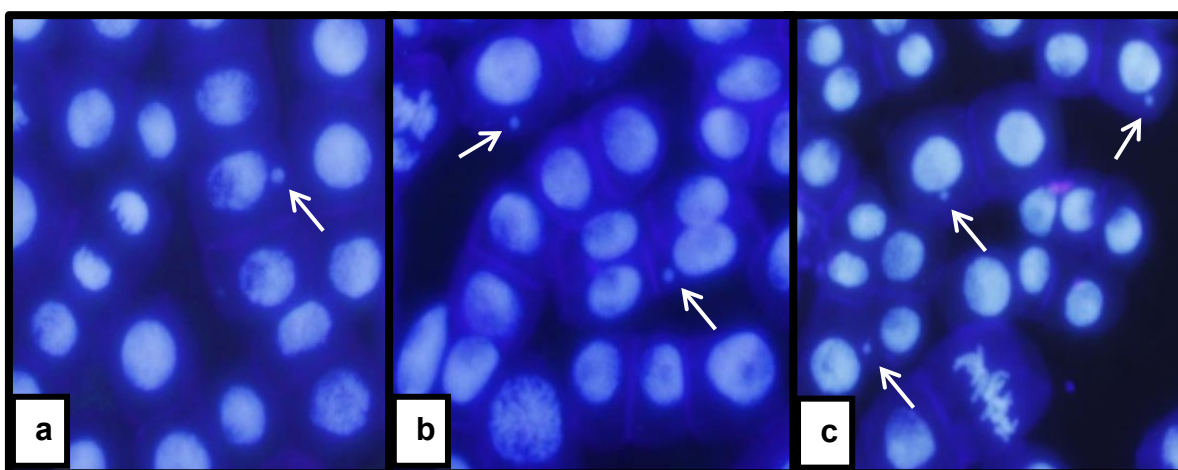
Como os resultados desses testes são analisados a partir da comparação do controle negativo com as diferentes concentrações das amostras avaliadas, quando o valor do IM é menor que o controle negativo, pode ser um indicativo de inibição do crescimento radicular pela presença de substâncias químicas tóxicas; por outro lado, quando o IM é maior que o controle negativo, é um indicativo de crescimento desordenado das células na divisão celular, podendo sugerir até mesmo uma possível indução de formação de tumores em seres humanos que venham entrar em contato com a amostra (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Genotoxicidade

Os bioensaios de genotoxicidade em *Allium cepa* incluem a frequência de micronúcleos em 1.000 células na interfase por bulbo e o número de aberrações cromossômicas (cromossomos atrasados, pontes cromossômicas e fragmentos cromossômicos) em 1000 anáfases-telófases.

O micronúcleo (MN) pode ser utilizado como um instrumento ou marcador biológico para detecção dos efeitos clastogênicos e aneugênicos em função da exposição a agentes genotóxicos. A figura 16 mostra alguns MN encontrados nas células de *A. cepa* do presente estudo.

Figura 16. Micronúcleos de *A. cepa* corados com fluorocromo Hoescht, as setas indicam os micronúcleos. a) Micronúcleo ponto L2, Córrego Liso. b) Micronúcleo ponto L3, Córrego Liso. c) Micronúcleo controle positivo, paracetamol.



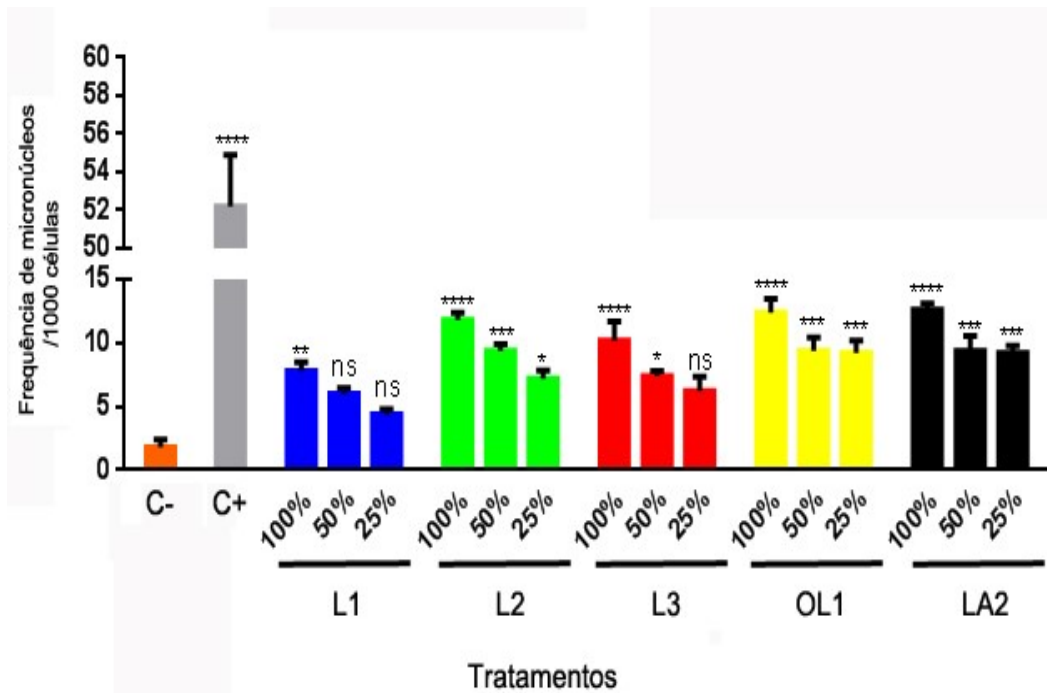
Fonte: Autoria própria.

Na avaliação da frequência de micronúcleos encontrados em *A. cepa* após exposição aos tratamentos com amostras dos efluentes os resultados são significativos, mostrando um aumento na frequência de MN nesses tratamentos (Figura 17).

As comparações entre o controle negativo e os pontos L2, OL1 e LA2 em todas suas diluições (100%, 50% e 25%) mostraram uma diferença significativa na frequência de micronúcleos, sendo que a maior significância prevaleceu nas diluições de 100% do afluente, na sequência as diluições de 50% e por último, apresentando menor frequência de MN, as diluições de 25%. Desta maneira, estes resultados demonstram que a frequência de Mn esta agindo de forma diluição-dependente (dose-dependente).

Os pontos L1 e L3 apresentaram resultados não significativos em algumas diluições, L1 nas diluições 50% e 25% e L3 na de 25%. Sendo as outras diluições destes pontos significativas e também com padrão diluição-dependente para as variações das frequências de MN. O ponto L1 do Córrego Liso, comparado com os pontos L2 e L3 do mesmo Córrego, foi o que apresentou menor frequência de MN, isso pode estar relacionado ao fato deste ponto se localizar mais a montante do maior centro industrial da cidade, o tornando menos tóxico para os organismos que ali habitam.

Figura 17. Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrados nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).



Fonte: Autoria própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo à $p < 0,05$.

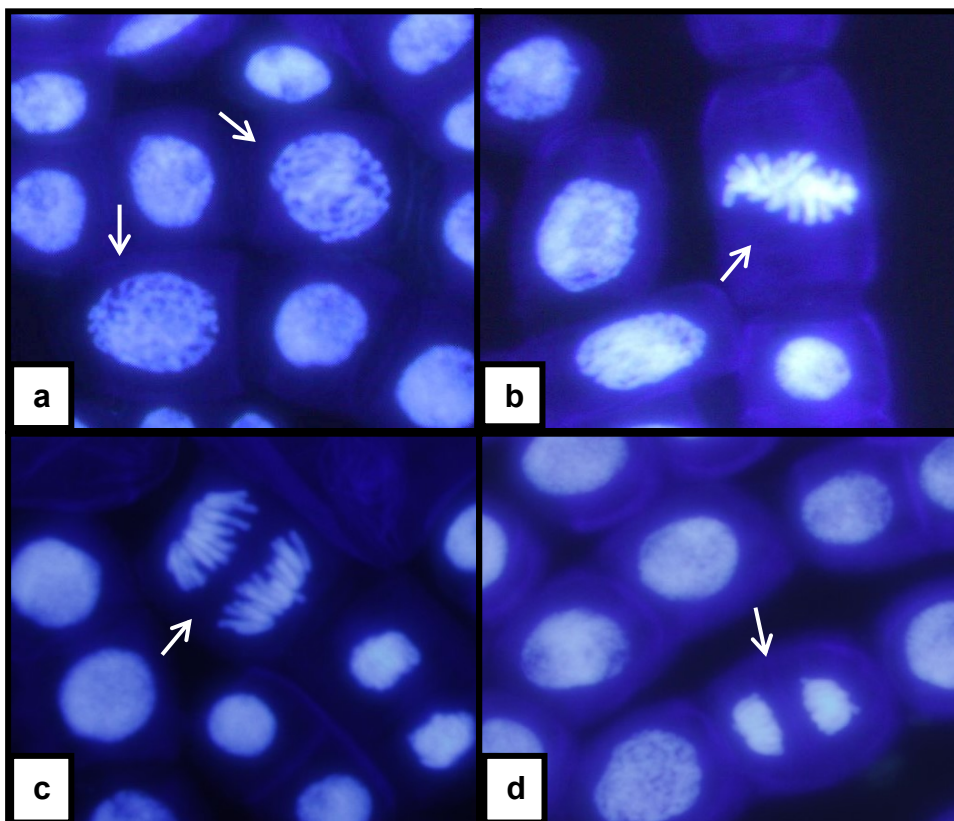
O aumento no número de micronúcleos em ambientes contaminados por efluentes industriais é muito visto na literatura, Pathiratne et al. (2015), relata que a indução de micronúcleos é indicativa de contaminações mutagênicas. Ou seja, a água destes locais deve conter agentes capazes de induzir alterações na molécula de DNA dos organismos e em alguns casos levar a indução de tumores (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Outra avaliação utilizada para mensurar a genotoxicidade é a frequência de aberrações cromossômicas encontradas nas células de *A. cepa* durante as fases da divisão celular. A divisão celular possui quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 18).

As aberrações cromossômicas consideradas no presente estudo (fragmentos cromossômicos, cromossomos atrasados e pontes anafásicas) estão indicadas na figura 19 e foram contabilizadas nas fases de metáfase, anáfase e telófase (HEMACHANDRA et al, 2017).

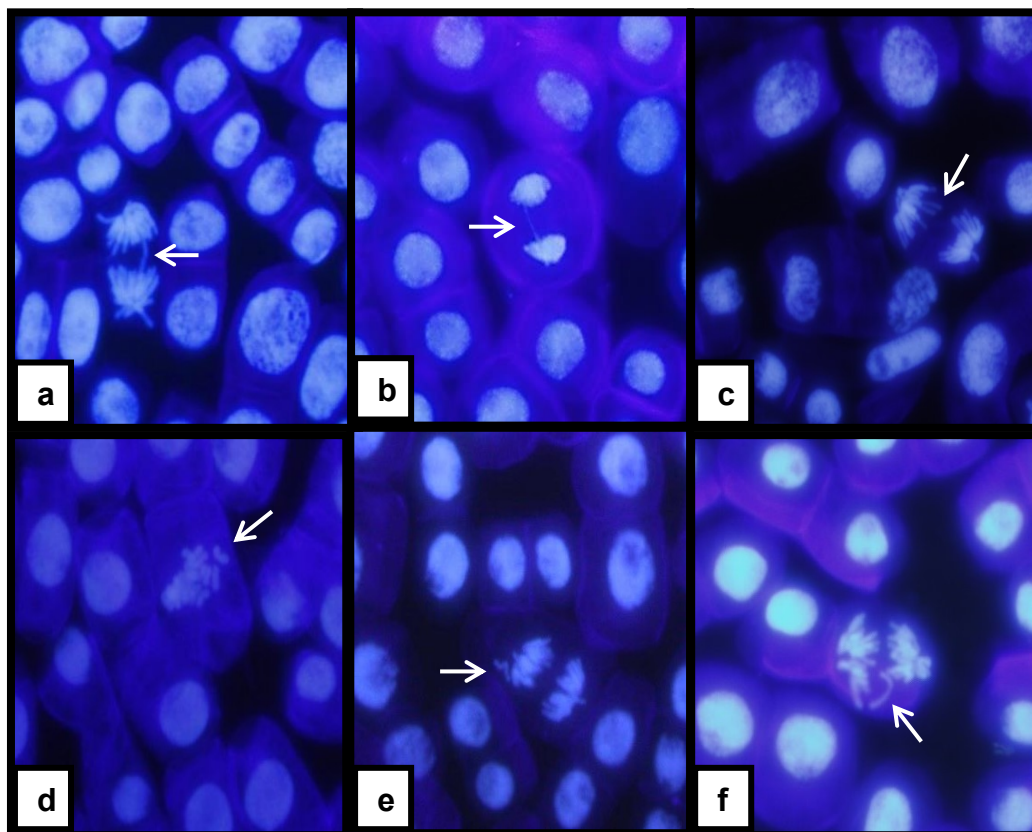
Pontes e fragmentos cromossômicos na anáfase e telófase indicam quebras cromossômicas devido a efeitos clastogênicos, enquanto cromossomos atrasados apontam para distúrbios do fuso mitótico por eventos aneugênicos (MASOOD, et al 2013). Ambos os eventos geradores de aberrações cromossômicas foram encontradas neste estudo, indicando a presença de agentes genotóxicos clastogênicos assim como aneugênicos no meio.

Figura 18. Células meristemáticas de *Allium cepa*, durante as fases da divisão celular: a) Prófase; b) Metáfase; c) Anáfase; d) Telófase a divisão celular.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Células meristemáticas de *Allium cepa* apresentando anormalidades (a) Ponte anafásica (b) Ponte telofásica. (c) Cromossomo atrasado. (d) Cromossomo perdido. (e) Cromossomo perdido. (f) Cromossomo perdido.



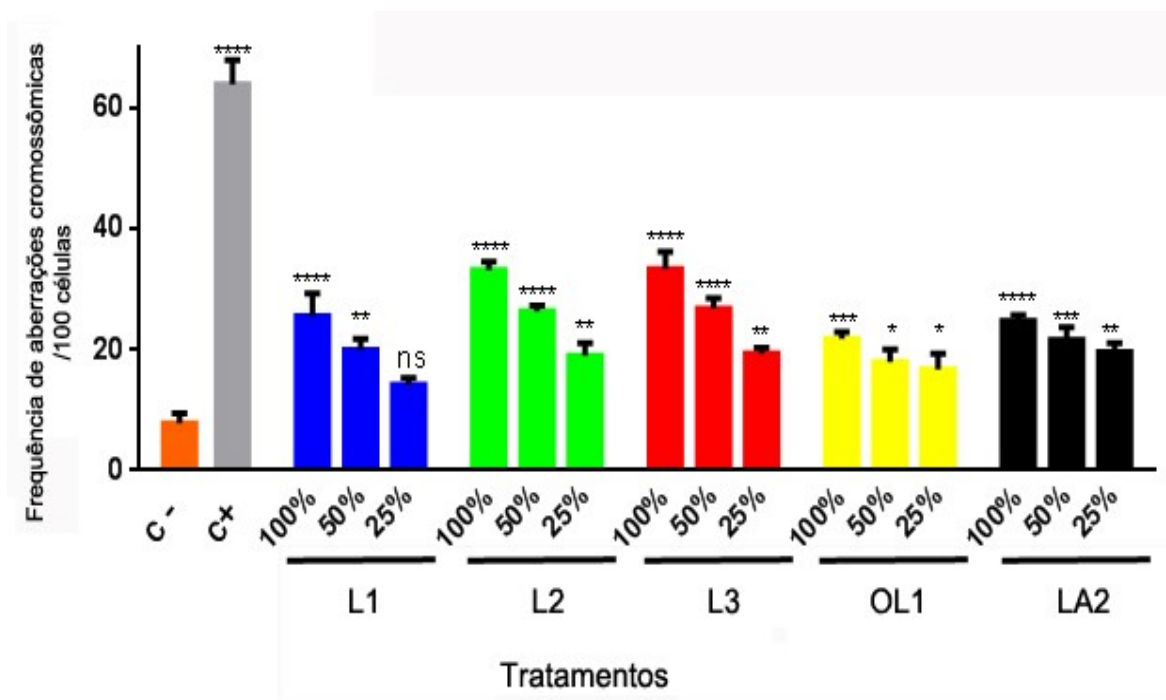
Fonte: Autoria própria.

A figura 20 traz os resultados obtidos na análise estatística das aberrações cromossômicas e assim como na avaliação da frequência de micronúcleos apresentou uma genotoxicidade relevante em todos os pontos analisados e também uma diluição dependente. Desta maneira, os pontos L1, L2, L3, OL1 e La2 apresentaram altas frequências de aberrações cromossômicas e as maiores foram encontradas nas diluições de 100% e foram abaixando com as menores diluições, 50% e 25%, respectivamente. Leme et al (2009) em seu trabalho relata a indução significativa de aberrações cromossômicas como sendo mais expressiva nas maiores diluições comparadas com as menores, o que ele cita como sendo uma indução de genotoxicidade influenciada pela diluição do tratamento.

Apenas o ponto L1, novamente, apresentou uma de suas diluições, 25%, não apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle negativo. Portanto se trata de mais um indicativo que nesse ponto a incidência de ações genotóxicas por contaminantes é menor, provavelmente por sua localização

como descrito anteriormente. Tal fato leva a fortes indícios de contaminação desse afluente, Córrego Liso, nos pontos a jusante por despejos de esgotos industriais.

Figura 20. Gráfico representativo da frequência de aberrações cromossômicas encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).



Fonte: Autoria Própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo à $p < 0,05$.

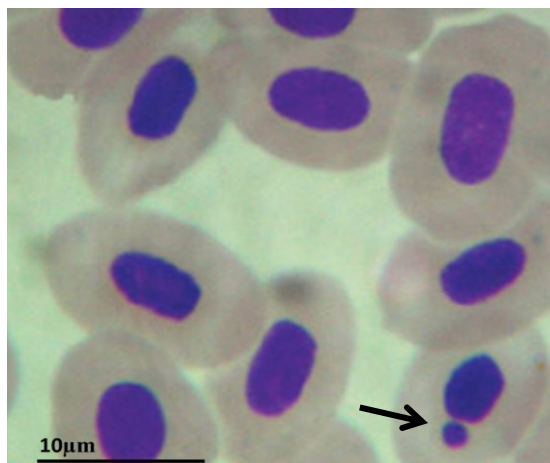
6.3.2. *Poecilia reticulata*

Poecilia reticulata também foi utilizado como um bioindicador de genotoxicidade neste estudo, para estas análises foram realizados o teste de micronúcleo (figura 21) e o teste de anormalidades celulares.

No teste de micronúcleo com *Poecilia reticulata* os pontos referência utilizados para comparação foram dois afluentes localizados na zona rural da cidade de Uberlândia, o Córrego do Paula (C1) e o Ribeirão Bom Jardim (C2). Ambos afluentes encontram-se em bom estado de conservação e por estarem distantes da área urbana não recebem influência de lançamento de esgotos domésticos e industriais. Outro fator que possibilitou a utilização desses dois afluentes como referência foram as análises dos parâmetros físico-químicos e os

resultados de IQA apresentados nesses recursos hídricos, que classificaram os dois como BONS em relação à qualidade de suas águas.

Figura 21. Micronúcleos de *P. reticulata* corados com Giemsa, a seta indica o micronúcleo.

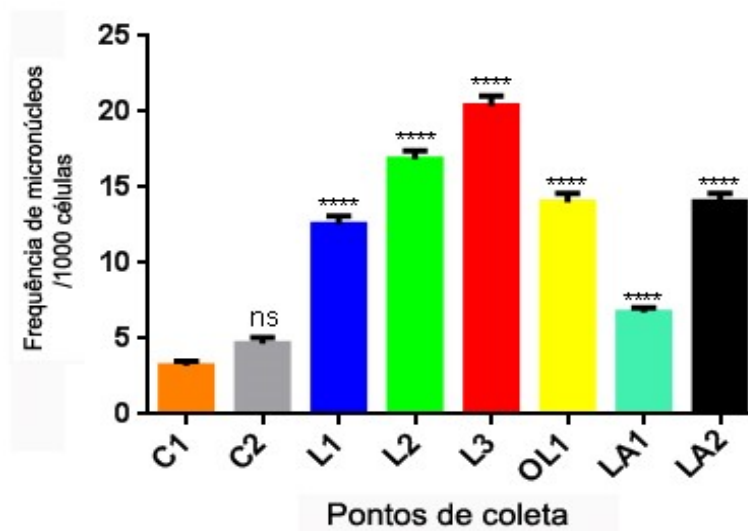


Fonte: Autoria própria.

Ambos os pontos referência, C1 e C2 (Figura 22) não apresentaram diferenças significativas nas frequências de MN, então o controle escolhido para as comparações com os outros afluentes foi o C1.

Todos os pontos de coleta (L1, L2, L3, OL1, LA1 e LA2) apresentaram uma diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, o que indica alta genotoxicidade dessas amostras de água para esses organismos, sendo o L3 o ponto com maior frequência de micronúcleos para *Poecilia reticulata*, ou seja, o ponto com água de maior potencial genotóxico. Este ponto se encontra no final do Córrego Liso e a montante dele existem muitas indústrias frigoríficas, têxteis e de laticínios que lançam seus efluentes nesse curso d'água. Já os pontos L1 e L2 do Córrego Liso, que se localizam anteriormente às maiores indústrias dessa região, apresentaram menores frequências de micronúcleo, podendo estar relacionado às suas localizações à montante da de maior concentração industrial. O mesmo ocorre no afluente Córrego Lagoinha, que apresenta maior índice de micronúcleos no ponto LA2 em comparação com seu ponto a montante LA1, isso porque o ponto LA1 está no início da cidade, sofrendo influência de esgotos domésticos de apenas dois bairros, enquanto o segundo se localiza mais ao centro da cidade, recebendo maiores influências da contaminação urbana.

Figura 22. Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ [comparando com o controle negativo (RP *P. reticulata*)].



Fonte: Autoria Própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo à $p < 0,05$.

O Córrego do Óleo apresentou altas frequências de MN para esse organismo e também trata-se de um afluente que recebe muito impacto ambiental por se localizar em uma área extremamente urbanizada.

Os maiores índices de genotoxicidade observados em *Poecilia reticulata* em relação a *Allium cepa*, provavelmente se devem ao fato desses organismos serem coletados *in situ* e estarem cronicamente expostos aos contaminantes presentes nestes afluentes, diferente da exposição aguda realizada em *Allium cepa*. Indimian et al. (1999), compararam índices de genotoxicidade gerados por exposição crônica e aguda e relataram que uma melhor correlação é observada em indivíduos cronicamente expostos. Outra possível explicação está relacionada ao fato destes organismos serem acumuladores de substâncias tóxicas, transferindo também estas substâncias para os próximos consumidores da cadeia alimentar, o que, além de estar prejudicando a própria fauna, também coloca em risco a saúde da população que pode vir a consumir peixes destes afluentes (SIBANDA, T. et al. 2015).

Também foi realizado o teste de frequência de anormalidades nucleares em *P. reticulata* e quando os dados gerados são analisados, os efeitos genotóxicos continuam sendo perceptíveis. Existe uma grande diferença estatística entre praticamente todos os afluentes com os controles negativos (C1 e C2), com alta significância (**** $p < 0.0001$). A incidência de variações nas formas nucleares dos eritrócitos de *P. reticulata* é indício de distúrbios no material genético que culminam nestas alterações morfológicas, sinalizando a presença de agentes genotóxicos nessas amostras de água, como pode ser observado na Tabela 8 e Figura 23. A utilização de testes que quantificam a frequência de micronúcleos em conjunto com frequência de anormalidades celulares sugere maior credibilidade para se avaliar o potencial genotóxico destes afluentes (AYLLON, et al. 2000).

Tabela 8. Frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ [comparando com o controle negativo (*P. reticulata*)].

Pontos	Binucleada	Lobada	Segmentada	Forma de rim
C1	6,0 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	3,1 \pm 0,4
C2	7,7 \pm 0,5 ns	3,1 \pm 0,3 ns	4,1 \pm 0,3 ns	4,1 \pm 0,4 ns
La1	14,5 \pm 0,5****	6,9 \pm 0,3 **	4,6 \pm 0,3 ns	4,4 \pm 0,2 ns
La2	29,4 \pm 0,7****	34,3 \pm 0,7****	9,4 \pm 0,4****	9,8 \pm 0,4****
OL1	27,9 \pm 0,6****	36,8 \pm 0,8****	8,3 \pm 0,3****	9,0 \pm 0,5****
L1	24,7 \pm 0,7****	49,8 \pm 1,0****	8,3 \pm 0,5****	9,9 \pm 0,4****
L2	27,9 \pm 0,5****	53,0 \pm 1,1****	9,9 \pm 0,4****	13,1 \pm 0,5****
L3	35,2 \pm 0,8****	60,6 \pm 1,2****	11,3 \pm 0,5****	16,0 \pm 0,7****

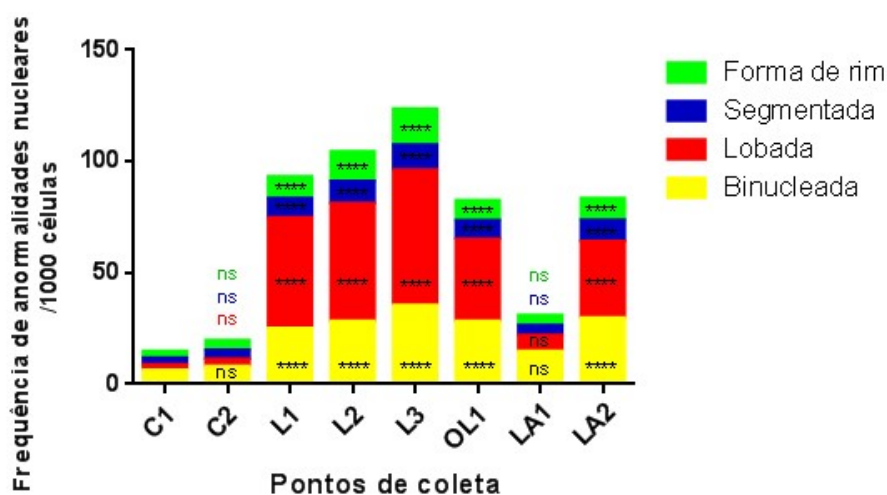
Fonte: Autoria própria.

Os maiores efeitos genotóxicos encontrados neste teste também ocorreram no ponto L3 do Córrego Liso, provavelmente pelos mesmos motivos já relatados anteriormente nos testes de micronúcleo de *Poecilia reticulata* e *Allium cepa*. O Córrego Liso e o Córrego Lagoinha mais uma vez apresentaram uma crescente

citotoxicidade de acordo com que seus cursos de água adentram aos lugares mais populosos da cidade de Uberlândia.

A utilização de testes que quantificam a frequência de micronúcleos em conjunto com frequência de anormalidades celulares sugere maior credibilidade para se avaliar o potencial genotóxico destes afluentes (AYLLON, et al. 2000).

Figura 23. Gráfico representando a frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ [comparando com o controle negativo (*P. reticulata*)].



Fonte: Autoria Própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo à $p < 0,05$.

6.4. Bioensaios *in vitro*

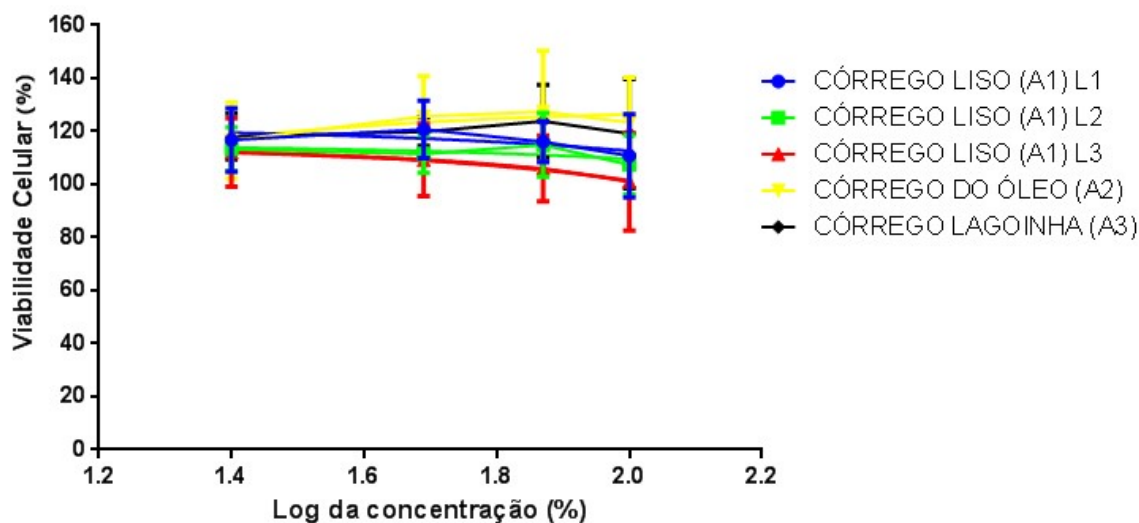
Os ensaios *in vitro* avaliaram a citotoxicidade e também a genotoxicidade das águas dos afluentes para os miócitos murinos C2C12.

Citotoxicidade

Para mensurar o potencial citotóxico desses afluentes também foi utilizado o teste de viabilidade celular por redução da resazurina. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras de água de todos os afluentes avaliados neste ensaio não apresentaram efeito citotóxico imediato. Na verdade, o que se observa ao analisar a curva de viabilidade celular apresentada na Figura 24 é que houve uma proliferação das células tratadas em relação ao controle negativo, uma vez que em todos os tratamentos a viabilidade ultrapassa os 100%.

Resultados semelhantes que corroboram com esses dados foram observados nos ensaios de citotoxicidade em *Allium cepa* relatados anteriormente nesse estudo e também em alguns trabalhos da literatura. Ferreira (2012) realizando o biomonitoramento do Rio Jaguari e Ribeirão Lavapés na região bragantina, Bianchi *et al.* (2015) avaliando a genotoxicidade e citotoxicidade de amostras de água da Bacia do Rio dos Sinos no sul do Brasil e Düsman *et al.* (2012), com estudos acerca do potencial citotóxico das águas dos riachos Mandacaru, Maringá, Miosótis e Nazaré na área urbana de Maringá, Estado do Paraná, constataram que não houve citotoxicidade significativa nos afluentes analisados e no trabalho de Ferreira (2012) a proliferação celular após os testes também demonstrou um aumento como o visto nos resultados obtidos no presente estudo.

Figura 24. Curva concentração-dependente da viabilidade celular da linhagem C2C12, tratadas com amostras de água de diferentes pontos do Rio Uberabinha. Cada ponto representa média \pm erro padrão de 2 experimentos independentes.



Fonte: Autoria Própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo ($p > 0,05$).

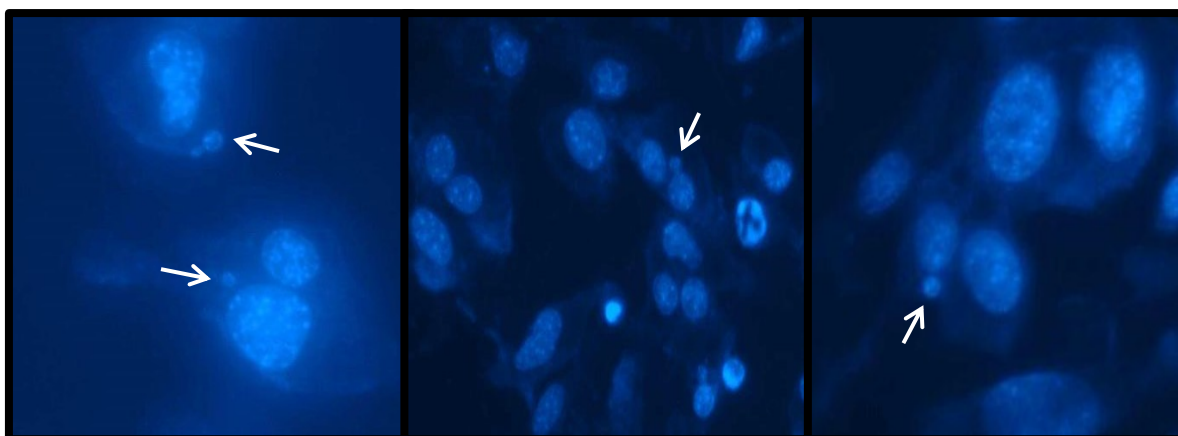
Genotoxicidade

O potencial genotóxico nos ensaios *in vitro* foi obtido por meio do teste de micronúcleo (MN) (Figura 25). Alguns micronúcleos observados neste estudo são apresentados na figura 25. Os pontos L2, L3, OL1 e LA2, como demonstrado na figura 27, apresentaram diferença estatística significativa na frequência de

micronúcleos quando comparados ao controle negativo. Apenas o ponto L1 na diluição de 25% não manteve esse padrão, o que pode ser justificado por se localizar próximo à nascente e não receber fortes lançamentos de esgoto doméstico e industrial no seu leito neste local.

Foi observado também que os resultados continuaram sendo diluição-dependentes na maioria dos pontos e que o Córrego Liso no ponto L3 é o que apresenta maior problemática, novamente trazendo os maiores valores de micronúcleo juntamente com o ponto L2 logo a montante do L3 (Figura 26).

Figura 25. Micronúcleo encontrado em célula C2C12 binucleada.



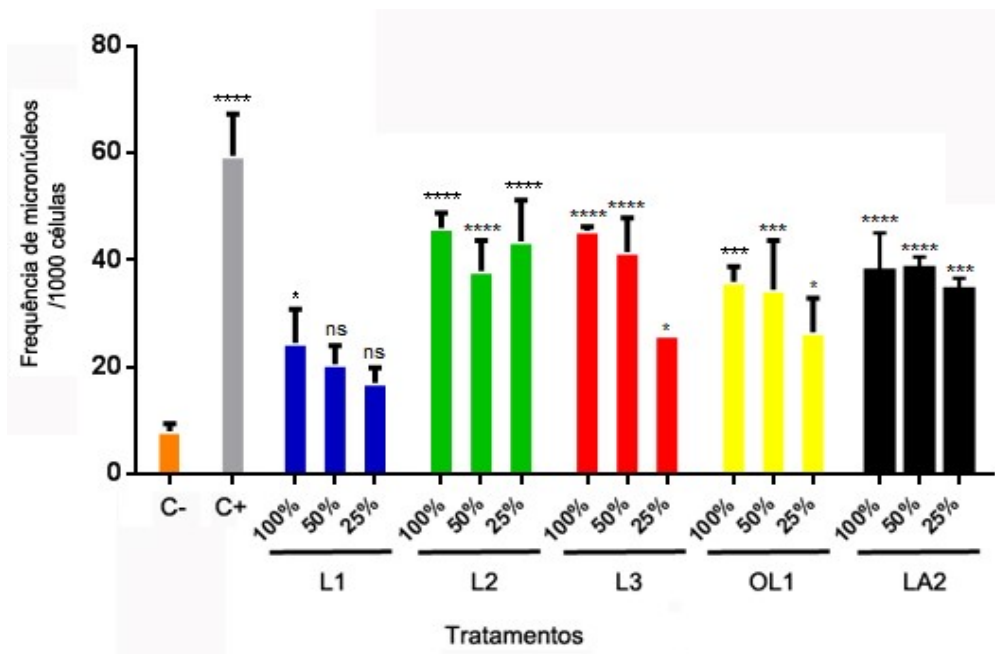
Fonte: Autoria própria.

Os resultados deste ensaio demonstraram padrões similares aos observados nos testes de genotoxicidade com *A. cepa* e *P. reticulata*, apresentando também altas frequências de micronúcleos encontradas nas células após exposição às amostras de água dos afluentes aqui avaliados, o que indica que estes afluentes são potencialmente danosos ao DNA dos organismos em questão.

A genotoxicidade encontrada nos resultados apresentados para *A. cepa*, *P. reticulata* e cultura de células C2C12 pode estar associada aos metais pesados, Cádmio e Chumbo, que foram identificados nas análises físico-químicas também realizadas no presente estudo.

Tais metais foram encontrados, na maioria dos afluentes analisados, em concentrações acima do limite de uso seguro da água estabelecido pelo CONAMA 357/05. Estes metais pesados provavelmente contribuíram de forma massiva para os efeitos citogenotóxicos até aqui descritos.

Figura 26. Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em células C2C12 de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$



Fonte: Autoria Própria com dados obtidos no software GraphPad Prism6. NS: não significativo ($p > 0,05$).

Vários pesquisadores têm demonstrado que o Cádmio apresenta diversos efeitos celulares, atuando na progressão do ciclo celular, proliferação, diferenciação, replicação e reparo de DNA e apoptose. Em altas concentrações ele possui efeitos citotóxicos, porém em concentrações menores que $1\mu\text{M}$, ele pode aumentar a síntese de DNA e a proliferação celular (BERTIN; AVERBECK, 2006). Esta indução da proliferação celular em baixas concentrações corrobora com o aumento do comprimento das raízes e do índice mitótico observados nos testes de *A. cepa* e da viabilidade celular em cultura.

Acredita-se que a genotoxicidade do Cádmio se deve tanto à ação direta no DNA, por meio de indução de estresse oxidativo gerando quebras nas fitas de DNA, quanto indireta, por meio da inativação de enzimas participantes dos mecanismos de reparo do DNA. Dentre os efeitos de tratamentos com Cádmio são descritas quebras de fita simples no DNA, aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmãs e falhas de ligação DNA-proteína em vários tipos de células de

mamíferos. (COOGAN; BARE; WAALKES, 1992; LIN *et al.*, 1994; BERTIN; AVERBECK, 2006; KARRI *et al.*, 2017).

O chumbo por sua vez, além de ser capaz de disparar o estresse oxidativo gerando radicais livres que conseqüente atacam o DNA, também é capaz de interagir covalentemente com os íons fosfato terciários presentes nos ácidos nucléicos e em proteínas, afetando assim o funcionamento destas importantes biomoléculas. Também foi demonstrado que o cloreto de chumbo afeta a fidelidade da síntese de DNA *in vitro* e inibe a síntese de DNA, RNA e proteínas *in vivo* (LIN *et al.*, 1994; XIE *et al.*, 2017; AKRAM *et al.*, 2018).

Os efluentes são liberados no ambiente aquático como misturas complexas e o conhecimento das suas interações tóxicas se torna de difícil constatação, desta maneira não é possível afirmar que os efeitos citogenotóxicos aqui evidenciados sejam causados apenas pela presença de Cádmiio e Chumbo, porém de acordo com a bibliografia este seria o principal motivo para tal desordem (HEWITT; MARVIN, 2005).

7. CONCLUSÃO

O biomonitoramento realizado nos afluentes do Rio Uberabinha utilizando testes *in vivo* com os bioindicadores *Allium cepa* e *Poecilia reticulata* e testes *in vitro* com cultura de célula C2C12 se mostrou efetivo, avaliando o potencial citogenotóxico da água desses afluentes sobre esses modelos experimentais.

As avaliações físico-químicas das amostras de água apresentaram parâmetros como Oxigênio Dissolvido, Coliformes Fecais, Demanda Bioquímica de Oxigênio, Fósforo Total, Turbidez, Sólidos Totais, Nitrogênio Amoniacal, Cádmiio e Chumbo em desconformidade com a legislação do CONAMA 357/05. O Índice de Qualidade da Água calculado a partir dos dados físico-químicos classificou os afluentes urbanos da cidade de Uberlândia aqui avaliados como “RUIM”. Sendo apenas os dois controles C1 e C2 classificados como “BOM” e por esse motivo foram escolhidos como pontos controle.

Somente essas duas avaliações já indicam que os Recursos Hídricos não se encontram adequados para as funções nas quais eles se enquadram (Classe 2 – CONAMA 357/05), que são: recreação, irrigação, pesca e consumo de água por animais. Porém essa classificação de águas, baseadas em características físicas,

químicas e bacteriológicas, não é capaz de mensurar os reais efeitos que essas desconformidades podem causar para o ecossistema como um todo. Dessa maneira faz-se necessário a utilização de metodologias capazes de diagnosticar o impacto gerado pela poluição presente no meio ambiente para os organismos que ali habitam, sendo o biomonitoramento a partir de análises do potencial citogenotóxico a melhor opção para a resolução desta problemática.

Todos os afluentes em avaliação não apresentaram efeitos citotóxico nos testes de comprimento das raízes e Índice Mitótico em *Allium cepa* expostas as amostras, o mesmo ocorreu com o teste de viabilidade celular em cultura de células. Ao contrário, muitos afluentes demonstraram proliferação celular quando comparado ao controle negativo, principalmente em suas diluições de 100%, sendo o L3 do Córrego Liso a amostra de água com maior destaque nessa proliferação celular. Ou seja, as amostras provocaram um aumento na capacidade mitogênica das células, tendo como efeito o aumento da taxa de divisão celular, possivelmente relacionado com a presença aumentada de matéria orgânica (avaliado pela DBO) e nutrientes presentes nessas amostras. Uma justificativa pode ser pelo fato de haver uma maior concentração de resíduos orgânicos advindos de despejos domésticos e industriais nesses cursos de água, fornecendo assim nutrientes para a proliferação celular. Por outro lado, poderia ser um indicativo de crescimento desordenado das células, sugerindo uma possível propriedade carcinogênica.

Diferente da citotoxicidade, grande parte das amostras de água dos afluentes apresentaram um alto potencial genotóxico, o que pode ser evidenciado em todos os testes de genotoxicidade aqui relatados. Nos testes de micronúcleo houve um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos das células tanto de *Allium cepa*, como de *Poecilia reticulata* e células C2C12 cultivadas *in vitro*.

Nessas análises as comparações entre o controle negativo e os pontos L2, L3 OL1, LA1 e LA2 em todas suas diluições (100%, 50% e 25%) mostraram um aumento no número de micronúcleos, sendo que a maior significância prevaleceu nas diluições de 100% dos afluentes. Desta maneira, estes resultados demonstram que a frequência de MN esta agindo de forma diluição-dependente (concentração-dependente).

Apenas o ponto L1 apresentou algumas diluições não significativas, colocando esse ponto como um dos menos poluídos de toda a avaliação, ficando o ponto LA1 em segundo lugar. Já o ponto L3, que se trata do local de confluência do Córrego Liso com o Rio Uberabinha, mais uma vez apresentou os maiores valores, podendo aferir que nesse ponto há fortes indicativos de poluição. O Córrego Liso como um todo, mas em especial no L3, está localizado em uma área de grande despejo de esgotos devido a presença de diferentes atividades industriais. Dessa forma, é de grande relevância o monitoramento de sua qualidade ambiental já que influenciará diretamente na qualidade da água do Rio Uberabinha, o principal curso de água que abastece a cidade de Uberlândia.

As Aberrações Cromossômicas para *Allium cepa* e Anormalidades celulares para *Poecilia reticulata* foram outras avaliações genotóxicas realizadas neste trabalho e seus resultados demonstraram padrões similares aos observados nos testes de micronúcleo, corroborando com os indícios de que estes afluentes são potencialmente danosos ao DNA dos organismos em questão e que a presença dos metais pesados Cádmio e Chumbo, constatada pelas análises físico-químicas, pode ser o motivo desse potencial genotóxico, pois tais substâncias já foram descritas na literatura como sendo potentes agentes que dispararam o estresse oxidativo gerando radicais livres que conseqüente atacam o DNA causando danos.

Os dados obtidos neste estudo podem auxiliar futuros trabalhos acerca dos impactos causados por poluentes ambientais para que possam ser criados planos de manejo aplicáveis para a recuperação e conservação ambiental da bacia do Rio Uberabinha.

Por fim, este trabalho demonstra a importância do biomonitoramento atuando em conjunto com as análises físico-químicas para assegurar a qualidade dos recursos hídricos que são essenciais para o desenvolvimento econômico, para a qualidade de vida das populações humanas e para a sustentabilidade dos ciclos no planeta.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMIGID, H.M. **New trends in genotoxicity testing of herbal medicinal plants.** In: GOWDER, S. (Org.). *New Insights into Toxicity and Drug Testing.* Rijeka: InTech, p. 89-120, 2013.

ABNT. NBR 9898: **Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.** Disponível em: <<http://licenciadorambiental.com.br/wp-content/uploads/2015/01/NBR-9.898-Coleta-de-Amostras.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2018.

AKRAM, Z. et al. **Lead induces DNA damage and alteration of ALAD and antioxidant genes mRNA expression in construction site workers.** Archives of Environmental and Occupational Health, v. 8244, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19338244.2018.1428523>>.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water.** Mutation Research/Genetic Toxicology, v. 343, n. 2–3, p. 121–135, 1995.

ALBERTINI, R. J. et al. **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans.** Mutation Research - Reviews in Mutation Research, v. 463, n. 2, p. 111–172, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00049-1)

ALIMBA, C. G. et al. **Micronucleus cytome assay in the differential assessment of cytotoxicity and genotoxicity of cadmium and lead in amietophrynus regularis.** EXCLI Journal, v. 17, p. 89–101, 2018.

APARECIDA, S. et al. **Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos.** Ciência Animal, v. 18, n. 1, p. 25–31, 2008.

ARAÚJO, F. G. et al. **Biomarkers and bioindicators of the environmental condition using a fish species (Pimelodus maculatus Lacepède, 1803) in a tropical reservoir in Southeastern Brazil.** Braz. J. Biol, v. 1, n. 2, p. 1–9, 2016.

ARIAS, A. R. L. et al. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100011>

ATHIRA, N.; JAYA, D. S. **The Use of Fish Biomarkers for Assessing Textile Effluent Contamination of Aquatic Ecosystems : A Review.** n. Narbonne 2000, 2018.

ATLI G., Canli M. (2010) **Response of antioxidant system of freshwater fish Oreochromis niloticus to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures.** Ecotoxicol Environ Safety 73:1884–1889, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.005>

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. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00033-4)

BAPTISTA, M.; CARDOSO, A. **Rios e cidades: Uma longa e sinuosa história.** Belo Horizonte, Revista UFMG, v. 20, n.2, p. 124-153, jul.-dez. 2013.

BARBÉRIO, A.; Voltolini, J. C.; Mello, M. L. S. **Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test.** Ecotoxicology, v. 20, n. 4, p. 927–935, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0602-8>

BARBÉRIO, A. **Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality.** InTech, Water Treatment 317-334pp, 2013.

BÉNÉRÉ, E. et al. **A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites.** Journal of Microbiological Methods, v. 71, n. 2, p. 101–106, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.07.014>

BERNARDES, M. B. J., NEHME, V. G. de F.; COLESANTI, M. T. de M. **As contribuições do ensino de geografia e da educação ambiental para o cotidiano.** Cadernos de educação. Pelotas, n.25, p. 163-176, jul./dez. 2005.

BERNARDES, M. B. J., SILVA, M. K. A. **Bacia Hidrográfica do Rio Uberabinha: a Disponibilidade De Água E Uso Do Solo sob a perspectiva da educação ambiental.** Tese (Doutorado em Geografia) Programa de Pós-graduação em Geografia. Área De Concentração Geografia E Gestão Do Território. 223p. 2007.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. **Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review).** Biochimie, v. 88, n. 11, p. 1549–1559, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.001>

BETTEGA J. M. P. R., et al. **Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano.** Ciência e Agrotecnologia. Lavras, v. 30, n. 5, p. 950-954. 2006.

BIANCHI, E. et al. **Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil.** Brazilian Journal of Biology, v. 75, n. 2 suppl, p. 68–74, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015000300012&lng=en&tlng=en>.

BIDAR, G., PRUVOT C, GARÇON G, VERDIN A, SHIRALI P, DOUAY F. **Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field.** Environ Sci Pollut Res 16:42–53. 2009. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0021-4>

BOLOGNESI, C., HAYASHI, M. **Ensaio de micronúcleo em animais aquáticos.** Mutagênese 26 (1), 205-213. 2011. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>

BONADA, N., PRAT, N., RESH, VH. e STATZNER, B. **Desenvolvimentos em aquático biomonitoração inseto: uma análise comparativa das abordagens recentes.** Revisão Anual Entomologia, vol. 51, p. 495-523. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151124>

BONASSI, S. et al. **An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans.** Carcinogenesis, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2007. <https://doi.org/10.1093/carcin/bql177>

BORGES, F. A. **Avaliação das Atividades Minerárias na Área de Nascentes do Rio Uberabinha.** 2008

BORGES, R. F. et al. **Mapeamento de áreas úmidas através de dados de sensoriamento remoto e técnicas de geoprocessamento na Bacia Hidrográfica do Ribeirão Bom Jardim – MG.** 2010.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. **Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando Allium cepa L. como bioindicador.** Revista Ambiente & Água. v. 10, n. 1, Taubaté, Jan/Mar., 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde.** – Brasília: Funasa, 112 p., 2014.

BRITES, V.L.C. & RANTIN, F.T. **The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, Phrynops geoffroanus, taken from two areas of the Uberabinha river.** Environmental Monitoring and Assessment 96: 273-281. 2004. <https://doi.org/10.1023/B:EMAS.0000031733.98410.3c>

BRITO, J. L. B. **Adequação das Potencialidades do Uso da Terra na Bacia do Ribeirão Bom Jardim no Triângulo Mineiro (MG): Ensaio de Geoprocessamento.** 2001. 184 p. Tese (Doutorado em Geografia) – Departamento de Geografia da Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BUSS, DF, BAPTISTA, DF, e NESSIMIAN, J.L. **Bases conceituais para a Aplicação de biomonitoramento em Programas de Avaliação da Qualidade da Água de rios.** Caderno Saúde Pública, 19, 465 - 473.2003.

CAMPOS, C. F. et al. **Biomonitoring of the environmental genotoxic potential of emissions from a complex of ceramic industries in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil, using Tradescantia pallida.** Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues, v. 79, n. 3, p. 123–128, 2016. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1118714>

CAMPOS, P. B. R.; VILELA, M. A. M. A. **Identificação de Impactos Ambientais no Setor Sul do Perímetro Urbano do Município de Uberlândia - Minas Gerais.** Universidade Federal de Uberlândia. 2008. Online. Disponível em: <<http://lsie.unb.br/ugb/sinageo/7/1014.pdf>>

CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. da S.; RADOS, P. V. **Teste dos Micronúcleos – Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal.** R. Fac. Odontol. 35 Porto Alegre, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, jan./dez. 2007.

CARVALHO, M. B. DE et al. **Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 48, n. 4, p. 317–322, 2002.

CARVALHO, H. Á. **Um Tradescantia Como bioindicador Vegetal na Monitoramento dos Efeitos clastogênicos das Radiações Ionizantes.** Radiol. Bras. 38: 459 - 462. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-39842005000600015>

CARRIJO, B. R.; BACARRO, C. A. D. **Análise sobre a erosão hídrica na área urbana de Uberlândia (MG).** Rev. on line Caminhos de Geografia, 1(2) 70-83, dez/2000. Disponível em: <http://www.ig.ufu.br/revista/volume02/artigo05_vol02.pdf>.

ÇAVAS, T., GÖZÜKARA, S. E. **Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in Oreochromis niloticus exposed to textile mill effluent.** Mutation Research, Amsterdam. v. 538 p. 81-91. (2003).

CHARALAMPOUS, N. et al. **A multidisciplinary assessment of river surface water quality in areas heavily influenced by human activities.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.69, n. 2, p.208–222, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0152-9>

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências.** Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2005.

COOGAN, T. P.; BARE, R. M.; WAALKES, M. P. **Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: Reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 113, n. 2, p. 227–233, 1992. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90118-C](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90118-C)

COSTA, A. C.; DOMINGUES, G.; DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. **Citotoxicidade das águas do Rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de Allium cepa L.** Bioscience Journal. Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 248-258, Jan./Fev., 2015.

CRUVINEL, P. B.; ROSOLEN, V. **Qualidade ambiental do Córrego Liso, Uberlândia (MG): Pesquisa de metais tóxicos nos sedimentos.** Apresentação de Trabalho/Outra, 2009.

DA ROCHA, M. P. et al. **Tools for monitoring aquatic environments to identify anthropic effects.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 190, n. 2, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6440-2>

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. **Biomonitoramento Ambiental.** 167-178.. Genética Toxicológica. Porto Alegre. 2003.

DAHSHAN, H., ABD-ELALL, A. M.; MEGAHED, A. M. **Trace metal levels in water, fish, and sediment from River Nile, Egypt: Potential health risks assessment.** J. Toxicol. Environ. Health A 76: 1183–87. 2013. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.848421>

DEFU, H.; RUIRUI, C.; ENHUI, Z., Na C, Bo, Y. et al. **A toxicidade bioensaios para a água dos rios negro de odor em Wenzhou. China.** Environ Sci Pollut Res 22 (3): 1731-1741. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2484-1>

DMAE - Departamento Municipal de Água e Esgoto. **Desenvolvimento e sustentabilidade da bacia do Rio Uberabinha: Ações de Conservação de Água e Solo Uberlândia/MG** Julho de 2015 Online. Disponível em: <http://www.abhaaraguari.org.br/uploads/7_editais/4_contrato_de_gestao_002_2012_igam/2016/24_2016/anexo_9.pdf>

DÜSMAN, E. et al. **Cytotoxic potential of waters of the streams Mandacaru, Maringá, Miosótis and Nazareth in the urban area of Maringá, Paraná State, Brazil.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 34, n. 3, p. 311–318, 2012. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/8275>>.

EL-SHAHABY, A.O; ABDEL MIGID, H.M; SOLIMAN MI & MASHALY, I.A. **Genotoxicidade rastreio de águas residuais industriais utilizando o Allium**

cepa ensaio de aberrações cromossômicas. Paquistão Jornal de Ciências Biológicas, 6, 1, pp. 23-28, ISSN 1812-5735. 2003.

FAROOQ, U., KOZINSKI, J. A., KHAN, M. A., and M. Athar, **"Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents -a review of the recent literature"** Bioresour. Technol., vol. 101, no. 14, pp. 5043-53, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.030>

FARIAS, E.M.C.; NASCIMENTO, L.A.; SANTOS, M.S.M.; SOUZA, M.M.O.; SOARES, A.M. **O Córrego do Óleo em Uberlândia-MG: Caracterização e condições de conservação ambiental.** Revista da Católica, Uberlândia, v. 1, n. 2, p. 105-118, 2009.

FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique.** Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

FERREIRA, G. M. **International Congress on University-Industry Cooperation – Taubate**, SP – Brazil – December 5. p. 1-8, 2012.

FILHO, F. J. DE P; MOURA, M. C. S. DE; MARTINS, R. V. **Fracionamento Geoquímico do Fósforo em Água e Sedimentos do Rio Corrente, Bacia hidrográfica do Parnaíba/PI.** Revista Virtual de Química ISSN 1984-6835, Volume 4, Número 6. 2012.

FISKESJÖ, G. **The Allium-test as a standard in environmental monitoring, Hereditas.** v. 102, p. 99-112, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. **Evaluation of the Firstten MeIc Chemicals in the Allium cepa.** Atlas, New York, v. 21, p.139 – 149, Dec. 1994.

FISKEJÖ, G. **The Allium cepa test in a Wasterwater Monitoring.** Environmental Toxicology and Water Quality, New York, v. 8, p.291 – 298, Aug. 1993. <https://doi.org/10.1002/tox.2530080306>

FRENZILLI, G., NIGRO, M., LYONS, B.P. **The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.** Mutat. Res. 681 (1), 80e92. 2009.

GADZAŁA-KOPCIUCH, R., BERECKA, B., BARTOSZEWICZ, J.; BUSZEWSKI, B. **Some considerations about bioindicators in environmental monitoring.** Pol. J. Environ. Stud. 13: 453-62. 2004.

GINEBREDA, A., KUZMANOVIC, M., GUASCH, H., de ALDAM, L., LÓPEZ-DOVAL, JC, MUÑOZ, I., et al. **Avaliação da poluição multi-química em**

ecossistemas aquáticos através de unidades tóxicas: priorização composto, mistura caracterização e as relações com descritores biológicos. Sei. Total de Environ. 468 - 469, 715 - 723. 2014.

GUERRA, M.; SOUZA, S. M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana.** Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; VILLAR, S.; ACUÑA PLAVAN, A. **Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay).** Marine Pollution Bulletin, v. 91, n. 2, p. 518–523, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.027>

HEINRICH, P. et al. **Assessment of cytotoxicity, genotoxicity and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) induction in sediment extracts from New Zealand urban estuaries.** Ecotoxicology, v. 26, n. 2, p.211–226, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1756-1>

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. **Cytogenotoxicity screening of source water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo test systems: Allium cepa root based and Nile tilapia erythrocyte based tests.** Water Research, v. 108, p. 320–329, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.009>>.

HEWITT, L. M.; MARVIN, C. H. **Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents.** Mutation Research - Reviews in Mutation Research, v. 589, n. 3, p. 208–232, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.02.001>

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (Allium cepa) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent.** Ecotoxicology and Environmental Safety 72. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.07.002>

HOUGHTON, P. et al. **The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity.** Methods, v. 42, n. 4, p. 377–387, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.003>

IGAM - Instituto Mineiro De Gestão Das Águas. **"Monitoramento da qualidade das águas superficiais na Bacia do Rio Paranaíba em 2006"**. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Gestão das águas, 2007.

INDIMIAN, R. I. C. V.; ARRIC, J. E. G.; LAMMARION, P. A. F. **An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and.** v. 18, n. 10, p. 2386–2391, 1999.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. **Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg).** Oecologia Brasiliensis. v. 12, n. 4, p: 680-693, 2008.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; GOEL, R.E.; MUSARRAT, J. **Biomangement of Metal Contaminated Soils.** Springer 477pp, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9>

KANEV, M. **Genotoxic evaluation of the Ergene River, Turkey, on mosquito fish, Gambusia affinis** (Baird. n. October 2016, 2017.

KAUR, R.; DUA, A. **Scales of freshwater fish Labeo rohita as bioindicators of water pollution in Tung Dhab Drain, Amritsar, Punjab, India.** J. Toxicol. Environ. Health A 78: 388–396. 2015. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.990072>

KOCAN, R. M.; SABO, K. M.; LANDOLT, M. L. **Cytotoxicity/genotoxicity: The application of cell culture techniques to the measurement of marine sediment pollution.** Aquatic Toxicology, v. 6, n. 3, p. 165–177, 1985. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(85\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(85)90002-5)

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa.** Centro Universitário Feevale, dissertação. Novo Hamburgo, 2009.

LAUGHINGHOUSE, H. D. et al. **Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of Microcystis aeruginosa (Chroococcales, Cyanobacteria) using the Allium cepa test.** Science of the Total Environment, v. 432, p. 180–188, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.093>

LEME, D. M.; APARECIDA, M.; MORALES, M. **Mutação Pesquisa / Avaliações em Mutation Research Allium cepa teste no monitoramento ambiental: Uma revisão sobre a sua aplicação.** v. 682, p. 71–81, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application.** Mutation Research - Reviews in Mutation Research, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>

LIN, R. H. et al. **Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells.** Environmental and molecular

mutagenesis, v. 23, n. 2, p. 143–9, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8143703>>.

MARLEY, R.; ABREU, M.; HORIZONTE, B. **Revista Brasileira de Biologia de uma bacia hidrográfica neotropical**. p. 1–12, 2018.

MASOOD, F.; MALIK, A. **Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils**. Science of the Total Environment. Amsterdam, v. 444, p. 153–160, 2013.

MERLO, C.; ABRIL, A. ; AME, MV; Arguelo, GA; Carreras, HA; CHIPPERO, MS et al. **Avaliação Integral de poluição no Rio Suquia (Córdoba, Argentina) como uma contribuição para programas de restauração de ecossistemas lóticos**. Ciência do Meio Ambiente Total, v. 409, p. 5034-5045, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv>. 2011.

MIELLI, A. C.; MATTA, MEM; NERSESYAN, A. ; SALDIVA, PH N; UMBUZEIRO, G. A. **Avaliação da genotoxicidade de lodo urbanas tratadas no Tradescantia micronúcleos ensaio**. Mutation Research, v. 672, p. 51-54, De 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.007>

MONTEIRO, M. et al. **Evaluation of cadmium genotoxicity in Lactuca sativa L. using nuclear microsatellites**. Environmental and Experimental Botany, v. 60, n. 3, p. 421–427, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.12.018>

MORENO, P. & CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do Rio das Velhas**. In: Ferracini V.L.; Queiroz S.C.N. & Silveira M.P. (Eds). Bioindicadores de Qualidade da Água. p. 95-116. 2009

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em Ancistrus multispinnis**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

NWANI, C.D., LAKRA, W.S., NAGPURE, N.S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B. & SRIVASTAVA, S.K. **Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish Channa punctatus (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis**. Food and Chemical Toxicology, 48: 202-208. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.041>

O'BRIEN, J. et al. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. European Journal of Biochemistry, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; JOHANNES, C., GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W., FOLLE, G. A.;

DRETS, M. E. **Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution.** Mutat. Res., v. 504, p. 17–36, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00076-3)

OECD - ORGANIZAÇÃO DE COOPERAÇÃO E DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Guideline for the testing of chemicals: Fish, acute toxicity test.** [S.l: s.n.], 1992.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. **Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste Allium cepa.** Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. v. 6, n. 1, p. 90-103, 2011.

PARRON, L. M. MUNIZ, D. H. F. **Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água.** Colombo: Embrapa Florestas, 2011.

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; DE SILVA, N. **Efficacy of Allium cepa test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 187, n. 12, p. 1–12, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4954-z>

PEREIRA, B. B.; DE CAMPOS, E. O. **Enzymatic Alterations and Genotoxic Effects Produced by Sublethal Concentrations of Organophosphorous Temephos in Poecilia reticulata.** Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues, v. 78, n. 16, p. 1033–1037, 2015. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1050566>

PÉRES, R. H. B. O. **Caminho das Águas: Impactos Ambientais da Drenagem de Águas Pluviais na Bacia do Córrego Liso na Cidade de Uberlândia - MG.** Tese (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal de Uberlândia. 204 p. 2005.

PINTO, P., ROSADO, J., MORAIS, M. e ANTUNES, I., 2004. **Metodologia de avaliação de bacias siliciosos do sul de Portugal.** Hydrobiologia, vol. 516, n. 1-3, p. 191-214. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000025266.86493.a2>

POLLACK, N.; CUNNINGHAM, A. R.; ROSENKRANTZ, H. S. **Persistência ambiental de produtos químicos e seus riscos cancerígenos para os seres humanos.** Mutat. Res. 528,81-91. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00097-6)

PREFEITURA MUNICIPAL DE UBERLÂNDIA. **Informações do Parque Victório Siquierolli.** Uberlândia, 2012. Disponível em:

<http://www.uberlandia.mg.gov.br/?pagina=secretariasOrgaos&s=51&pg=138>.
Acessado em: junho de 2012.

RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. F.; NASIRUJJAMAN, K. **A study on genotoxicity of textile dyeing industry effluents from Rajshahi, Bangladesh, by the Allium cepa test.** Chemistry and Ecology, v. 33, n. 5, p. 434–446, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02757540.2017.1316491>>.

RASHED M. N. **Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake, Environ Int;** 27(1): 27-33. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00050-2)

REZENDE, P. S.; SOUZA, J. R.; SILVA, G. O.; RAMOS, R. R.; SANTOS, D. G. **Qualidade ambiental em parques urbanos: levantamento e análises de aspectos positivos e negativos do Parque Municipal Victório Siquierolli – Uberlândia – MG.** Observatorium: Revista Eletrônica de Geografia, Uberlândia (MG), v. 4, n.10, p. 53-73, ago. 2012.

SALA, L. F., S. I. GARCÍA, J. C. GONZÁLEZ, M. I. FRASCAROLI, S. BELLÚ, F. MANGIAMELI, P. BLANES, M. H. MOGETTA, V. ANDREU, A. M. ATRIA, and J. M. SALAS, **"Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho"** An. la Real Soc. Espa-ola Química, vol. 106, no. 2, pp. 114-120, 2010.

SCHIMIDT, W., WILLMITZER, H., BORNMANN, K. & PIETSCH, J. **Produção de beber água a partir de água bruta contendo cianobactérias estudos planta piloto para avaliar o risco de microcistina break-through.** Toxicologia Ambiental, 17, 4, pp. 375-385, ISSN 1522-7278. 2002

SEKABIRA, K.; Oryem Origa, H.; Basamba, T. A.; Mutumba, G.; Kakudidi, E. **Assessment of heavy metal pollution in the urban stream sediments and its tributaries.** Int. J. Environ. Sci. Tech., 7 (3), 435-446 (12 pages). 2010.

SEMAD - SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DE MINAS GERAIS. **Aperfeiçoamento do monitoramento da qualidade das águas da Bacia do Alto Curso do Rio das Velhas.** 2004.

SERIANI, R. et al. **Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarkers in the fish Oreochromis niloticus (Cichlidae).** Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 7, n. 2, p. 67–72, 2012. <https://doi.org/10.5132/jbse.2012.02.010>

SIBANDA T, SELVARAJAN R, TEKERE M. **Urban effluent discharges as causes of public and environmental health concerns in South Africa's aquatic milieu.** Environ Sci Poll Res Int 22(23):18301– 18317.

<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5416-4>.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5416-4>

2015.

STENERT, L. **São os riachos da bacia do Rio dos Sinos da boa qualidade da água ? macroinvertebrados aquáticos podem responder à pergunta.** v. 70, n. 4, p. 1207–1215, 2010.

STRBAC, S., KAŠANIN-GRUBIN, M., JOVANČIĆEVIĆ, B.; SIMONOVIĆ, P. 2015. **Bioaccumulation of heavy metals and microelements in silver bream (*Brama brama* L.), northern pike (*Esox lucius* L.), sterlet (*Acipenser ruthenus* L.), and common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Tisza River, Serbia.** J. Toxicol. Environ. Health A 78: 663–665, 2015.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1023406>

TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE IV H.D. **Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test.** In: SRIVASTAVA, J.K. (Org.). Environmental Contamination. Rijeka: InTech Publisher. p. 137–56, 2012.

TORRES DE LEMOS, C. et al. **River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 66, n. 3, p. 391–401, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.004>

VARDY, D. W., DOERING, J. A., SANTORE, R., RYAN, A., GIESY, J. P.; HECKER, M. **Assessment of Columbia River sediment toxicity to white sturgeon: Concentrations of metals in sediment, pore water and overlying water.** J. Environ. Anal. Toxicol. 5: 2161–0525. 2015.

VASCONCELOS, M. G. **Avaliação integrada da qualidade da água do Rio Uberabinha - MG com base na caracterização química dos sedimentos e de espécimes da ictiofauna.** Tese (Doutorado em Química) - Programa Multi-institucional de Doutorado em Química da UFG/UFMS/UFU. 188 p. 2012.

VENUGOPAL, T.; Giridharan, L.; Jayaprakash, M. **Characterization and risk assessment studies of bed sediments of River Adyar-An application of speciation study.** Int. J. Environ. Res., 3 (4), 581-598 (18 pages). 2009.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamentos de esgotos.** Livro, F 60. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

WILLIAMS, P. L. et al. **Principles of Toxicology Environmental and Industrial Application.** New York, John Wiley e Sons, 2002.

XIE, J et al. **Combined toxicity of cadmium and lead on early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas***. Invertebrate Survival Journal, v. 14, p. 210–220, 2017. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85019217185&partnerID=40&md5=8dd349422932373f40035434fb8c8915>>.

YAKUBU, M. B. **Biological approach to oil spills remediation in the soil**. African Journal of Biotechnology, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, Dec. 2007. <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2437>

ZEGURA, B., HEATH, E., CERNOSA, A. e FILIPIC, M. **Combinação de bioensaios in vitro para a determinação do potencial citotóxico e genotóxico de águas residuais, as amostras de água e de água potável à superfície**. Chemosphere, vol. 75, no. 11, p. 1453-1460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.041>. PMID: 19307011. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.041>

ZEMAN, C., RICH, M.; ROSE, J. **World water resources: Trends, challenges, and solutions**. Reviews in Environmental and Science Bio/Technology, v. 5, p. 333-346, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4089-8>