



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

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO UBERABINHA, EM ÁREAS
URBANAS DO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA (MINAS GERAIS, BRASIL), POR
MEIO DE TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.**

Discente: Bruna Mohn Terra Santos

Orientador: Profa. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

UBERLÂNDIA - MG

2018



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

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO UBERABINHA, EM ÁREAS
URBANAS DO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA (MINAS GERAIS, BRASIL), POR
MEIO DE TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.**

Discente: Bruna Mohn Terra Santos

Orientador: Profa. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

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

UBERLÂNDIA - MG

2018

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

S237a Santos, Bruna Mohn Terra, 1989-
2018 Avaliação da qualidade da água do Rio Uberabinha, em áreas urbanas do município de Uberlândia (Minas Gerais, Brasil), por meio de testes de citotoxicidade e genotoxicidade. [recurso eletrônico] / Bruna Mohn Terra Santos. - 2018.

Orientador: 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.2018.589>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética 2. Água – Qualidade – Uberabinha, Rio (MG). 3. Técnicas de Cultura de Células. I. Morelli, Sandra, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Gloria Aparecida - CRB-6/2047



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

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO UBERABINHA, EM ÁREAS
URBANAS DO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA (MINAS GERAIS, BRASIL), POR
MEIO DE TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.**

DISCENTE: Bruna Mohn Terra Santos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Dra. Sandra Morelli

Examinadores:

Data da Defesa: _____ / _____ / _____

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

(Sandra Morelli)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Raquel e Romeu, por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por me conceder saúde e força para superar quaisquer dificuldades.

À Universidade Federal de Uberlândia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte e apoio financeiro.

Aos meus pais, a quem eu devo tudo que sou, por todo carinho, paciência e apoio incondicional.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Sandra Morelli e Prof. Dr. Robson de Oliveira Júnior, por todas as oportunidades oferecidas e por todos os ensinamentos fundamentais para realização deste trabalho.

À minha amiga Danyele, por todo apoio e companhia durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas Carine, Lorena e Ana Carolina, que dedicaram parte do seu tempo para me auxiliar em meus experimentos.

Aos Profs. Drs. Boscolli Barbosa Pereira e Edimar Olegário de Campos Junior, por aceitarem o convite para avaliarem este trabalho e por todas as suas contribuições.

A todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da ordem sequencial de respostas a poluentes em um sistema biológico.....	5
Figura 2. Esquema do mecanismo de formação de micronúcleo em células.....	6
Figura 3. <i>Poecilia reticulata</i>	8
Figura 4. Esquema da ação da Citocalasina B.....	10
Figura 5. Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Uberabinha.....	12
Figura 6: Mapa evidenciando os pontos de coleta no Rio Uberabinha na cidade de Uberlândia-MG.....	14
Figura 7: Imagem representativa de micronúcleo encontrado em eritrócito de <i>Poecilia reticulata</i>	26
Figura 8: Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta.....	26
Figura 9: Gráfico representativo das taxas de crescimento das raízes de <i>A. cepa</i> de acordo com cada ponto de coleta.....	28
Figura 10: Representação de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , durante a divisão celular.....	29
Figura 11: Gráfico representativo do Índice Mitótico encontrado nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> de acordo com cada ponto de coleta.....	30
Figura 12: Representação de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> apresentando anormalidades.....	31

Figura 13: Gráfico representativo da frequência de anormalidades cromossômicas encontradas nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> de acordo com cada ponto de coleta.....	31
Figura 14: Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrados nas células meristemáticas de <i>A. cepa</i> de acordo com cada ponto de coleta.....	32
Figura 15: Curva concentração-dependente da viabilidade celular da linhagem C2C12, tratadas com amostras de água de diferentes pontos do Rio Uberabinha..	33
Figura 16: Imagem representativa de micronúcleo encontrado em célula C2C12 binucleada.....	34
Figura 17: Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em células C2C12 de acordo com cada ponto de coleta.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas dos pontos de coleta no Rio Uberabinha.....	15
Tabela 2: Classes de água doce e seus usos de acordo com a resolução do CONAMA 357/2005.....	21
Tabela 3: Parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta do Rio Uberabinha.....	22
Tabela 4: Resultados da avaliação do IQA dos pontos do Rio Uberabinha e da Represa.....	25
Tabela 5: Frequência de anormalidades nucleares em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC – Anormalidades Cromossômicas
- AN – Anormalidades Nucleares
- ANA – Agência Nacional de Águas
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- C2C12 – Mioblasto murinho
- DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgoto
- ETE – Estação de Tratamento de Esgoto
- IARC – International Agency for Research on Cancer
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IGAM – Instituto Mineiro de Gestão de Águas
- IM – Índice Mitótico
- IPCS – International Programme of Chemical Safety
- IQA – Índice de Qualidade da Água
- MG – Minas Gerais
- MN – Micronúcleo
- OECD – Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
- STD – Sólidos Totais Dissolvidos
- UNEP – United Nations Programme

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Avaliação dos recursos hídricos.....	3
1.2. O teste do micronúcleo.	5
1.3. Biomarcadores em Peixes.	7
1.4. Biomarcadores em <i>Allium cepa</i>	9
1.5. Biomarcadores em Cultura de Células.....	10
1.6. Caracterização da Área de Estudo.	11
2. OBJETIVO	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Sítios de Estudo e Procedimento de Coleta das Amostras de Água.....	14
3.2. Parâmetros Físico-químicos.....	15
3.3. Índice de Qualidade da Água	16
3.4. Testes com Peixes	16
3.5. Testes com <i>Allium cepa</i>	17
3.6. Testes com Cultura de Células	18
3.7. Análise Estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Parâmetros Físico-químicos e Índice de Qualidade de Água.....	20
4.2. Testes com Peixes	25
4.3. Testes com <i>Allium cepa</i>	28
4.4. Testes com Cultura de Células	33
4.5. Análise comparativa dos testes.....	35
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS.....	38

RESUMO

A água é um recurso fundamental para a manutenção da vida, para realizar a sua preservação é necessário que a sua qualidade seja avaliada adequadamente utilizando, além de análises dos parâmetros físico-químicos, ensaios ecotoxicológicos com organismos vivos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade da água do Rio Uberabinha em quatro pontos distintos, em áreas urbanas da cidade de Uberlândia (MG), por meio de testes *in vivo* e *in vitro* de genotoxicidade e citotoxicidade, utilizando três bioindicadores diferentes: *Poecilia reticulata*, *Allium cepa* e cultura de células C2C12. Foram coletadas amostras de água de quatro pontos distintos (P1, P2, P3 e P4), que foram submetidas a análises físico-químicas. Para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade foram utilizados como biomarcadores: índice mitótico, micronúcleo, anormalidades nucleares e anormalidades cromossômicas. A partir dos dados obtidos foi possível concluir que P1 não apresentou efeitos tóxicos. As análises de P2 indicaram presença de uma grande quantidade de matéria orgânica e de cádmio, o que resultou em índices intermediários de citotoxicidade e genotoxicidade. Além de cádmio, as análises de P3 detectaram chumbo, provável causa para o alto efeito genotóxico desse ponto. Já o ponto P4 apresentou ações genotóxicas e citotóxicas com relativa significância. Essas alterações nos parâmetros físico-químicos, e os efeitos genotóxico e citotóxicos observados nos diferentes pontos, podem ser consequência do descarte de efluentes domésticos e industriais, tudo isso pode interferir na comunidade ecológica local.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Poecilia reticulata*, cultura de células C2C12, micronúcleo.

ABSTRACT

Water is a fundamental resource for the maintenance of life. In order to carry out its preservation, it is necessary that its quality is properly evaluated using, besides physical and chemical parameters analyses, ecotoxicological tests with living organisms. Therefore, the present study aimed to evaluate the quality of Uberabinha River's water, in four distinct sites in the city of Uberlândia (MG), with *in vivo* and *in vitro* tests of genotoxicity and cytotoxicity, using three different bioindicators: *Poecilia reticulata*, *Allium cepa* and culture of C2C12 cells. Water samples were collected from four different sites (P1, P2, P3 and P4), which were submitted to physical-chemical analysis. To evaluate the cytotoxicity and genotoxicity the followings biomarkers were used: mitotic index, micronucleus, nuclear abnormalities and chromosomal abnormalities. With the data obtained, it was possible to conclude that P1 had no toxic effects. Analyzes of P2 indicated the presence of a large amount of organic matter and cadmium, which resulted in intermediate rates of cytotoxicity and genotoxicity. In addition to cadmium, the P3 analyzes detected lead, a probable cause for the high genotoxic effect of this point. The P4 site presented genotoxic and cytotoxic actions with relative significance. These changes in the physico-chemical parameters, and the genotoxic and cytotoxic effects observed at different sites, may be a consequence of the disposal of domestic and industrial effluents, all of which may interfere with the local ecological community.

Keywords: *Allium cepa*, *Poecilia reticulata*, culture of C2C12 cells, micronucleus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Avaliação dos recursos hídricos

O termo recursos hídricos é utilizado para se referir à gestão do uso da água, que envolve o fornecimento desta para os seres humanos utilizarem no abastecimento de água, descarte de resíduos, transporte, recreação, geração de energia e uso industrial. Fica evidente a importância deste recurso natural que, apesar de ser renovável, é finito (COSTA et al., 2012).

Segundo a Agência Nacional de águas (ANA, 2018), o uso deste recurso precisa ser bem pensado, pois estima-se que apenas 2,5%, da água existente no mundo, seja água doce. Dessa fração, 69% está congelada em geleiras, 30% são águas subterrâneas, e apenas 1% encontra-se nos rios. Esses dados revelam o quanto é essencial a preservação dos recursos hídricos na Terra.

Tucci, Hespanhol e Netto (2001) apontam que no Brasil os recursos hídricos superficiais representam 50% do total dos recursos da América do Sul e 11% dos recursos mundiais, no entanto a distribuição desses recursos não é uniforme. No Brasil a região Sudeste possui a maior população e apenas 6% da água doce de todo país. Já a região Norte, possui 68,5% da água, e apenas 7,4% da população. Enquanto a região Sul possui 6,5%, a Centro-Oeste 15,7% e o Nordeste 3,3% (OLIVEIRA, 2014).

De acordo com Jackson (2001), a crescente demanda por recursos hídricos cria uma necessidade urgente de vincular a pesquisa com a melhoria da gestão da água, pois o monitoramento adequado, avaliação e previsão do estado desses recursos ajudarão a alocar a água de uma maneira mais eficiente entre as necessidades existentes.

Para realizar a preservação dos recursos hídricos faz-se necessário a utilização de técnicas capazes de identificar o estado da qualidade da água. Apesar da determinação de parâmetros físico químicos ser muito utilizada e de extrema importância, essa técnica pode ser utilizada juntamente com ensaios ecotoxicológicos em organismos vivos, pois esses interagem com os poluentes levando a resultados mais fidedignos (CAIRNS-JUNIOR, 2002).

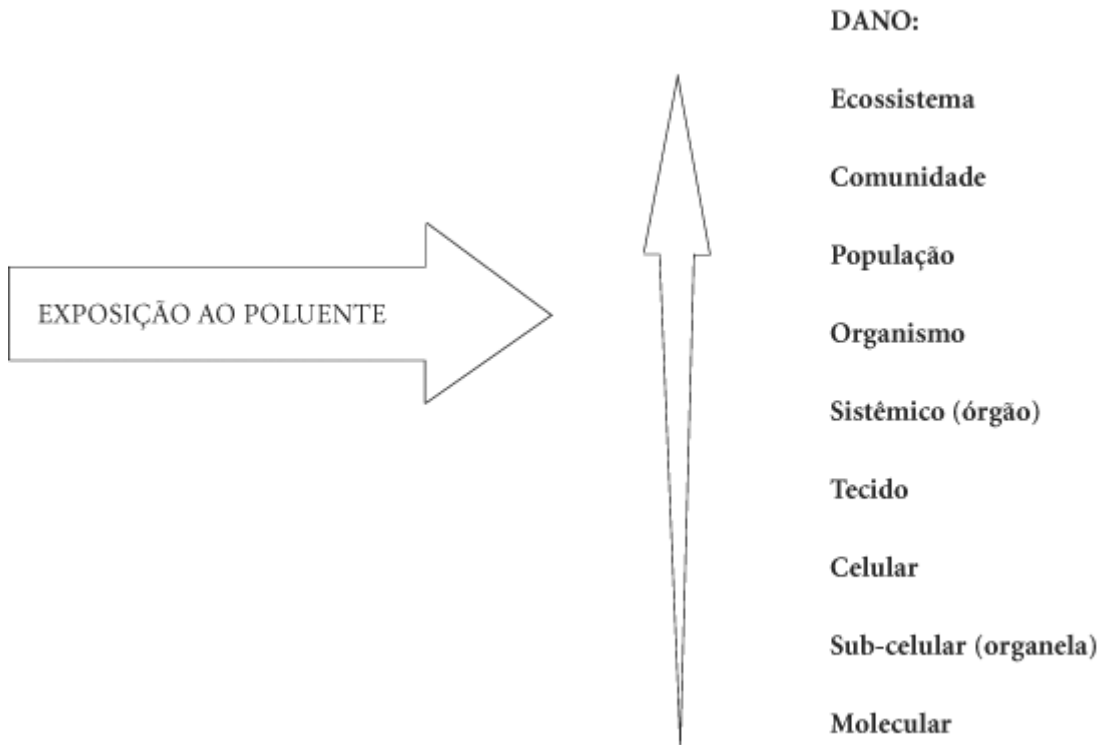
É essencial para a saúde do ecossistema e do homem, que haja o controle da toxicidade de resíduos lançados no ambiente aquático. Para demonstrar essa toxicidade podem ser utilizados testes de ecotoxicidade, baseado no fato de que se um agente é tóxico para uma ou mais espécies, é provável que seja tóxico para importantes componentes do ecossistema, sendo assim, capaz de causar impacto ambiental negativo (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

A ecotoxicologia aquática é a ciência que auxilia na resolução dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos. Utilizando ensaios ecotoxicológicos como ferramenta, é possível avaliar alguns fatores que não são observados através das variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos dos poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). A poluição aquática é caracterizada pela mistura de componentes químicos, cujas interações podem modificar a toxicidade da substância isolada por meio do sinergismo ou antagonismo (LLORENTE et al., 2012).

Para avaliar a qualidade de recursos hídricos é necessário utilizar ferramentas biológicas que indiquem o estresse e os efeitos que os poluentes podem causar a este meio, fazendo possível o estabelecimento de relações de causa-efeito. Estas ferramentas são chamadas de biomarcadores, que são utilizados para avaliar as ações de diferentes contaminantes como os metais, compostos orgânicos e agrotóxicos (FREIRE et al., 2008).

Com a utilização de biomarcadores, é possível perceber os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes. Essa mudança pode ser observada em diferentes níveis de organização biológica (Figura 1), desde níveis moleculares e celulares, até mudanças comportamentais, que podem estar relacionados à uma exposição a um determinado ambiente contaminado (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Figura 1. Representação esquemática da ordem sequencial de respostas a poluentes em um sistema biológico.



Fonte: ARIAS et al., 2007.

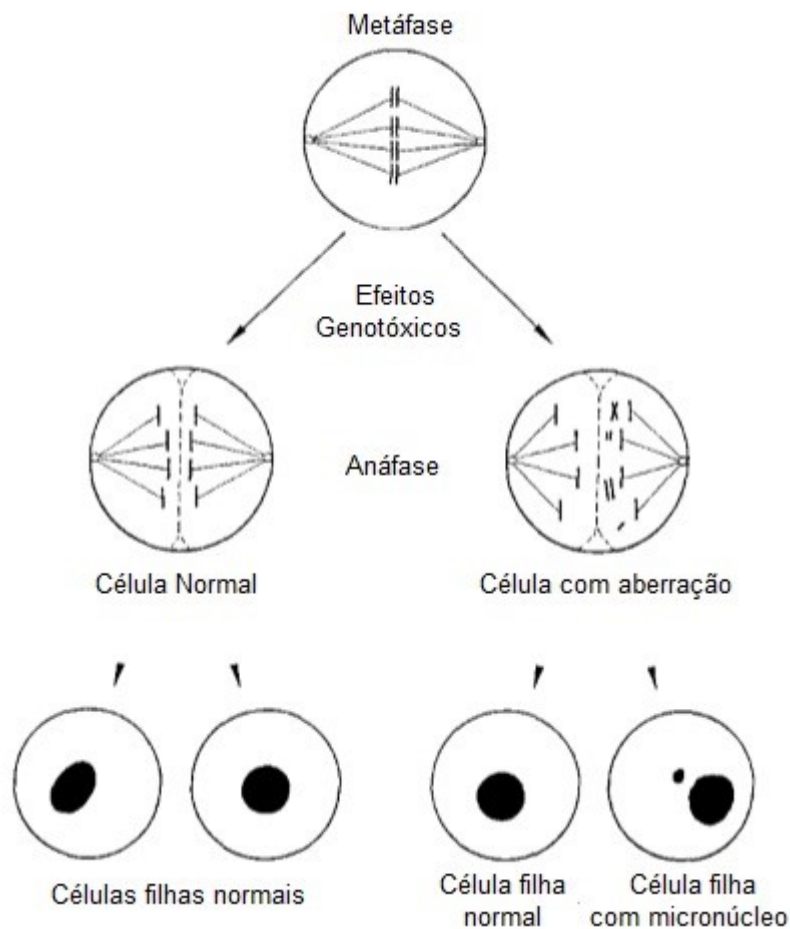
Dentre os diversos danos que os contaminantes podem causar, os efeitos carcinogênicos e mutagênicos são os mais perigosos, pois podem causar danos por várias gerações. Para avaliar estes perigos é indicado a aplicação de biomarcadores de genotoxicidade, sendo que o teste do micronúcleo (MN) é uma das técnicas mais adequadas para identificar respostas integradas às misturas complexas de contaminantes (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

1.2. O teste do micronúcleo.

A formação dos micronúcleos se dá a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal depois da anáfase (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975). De acordo com os mesmos autores esse micronúcleo é formado a partir dos seguintes eventos (Figura 2): na anáfase, cromátides acêntricas e fragmentos de cromossomos ficam para trás

quando os elementos centrais se movem para os pólos do fuso; depois da telófase, os cromossomos não danificados, bem como os fragmentos centrais, dão origem a núcleos-filhos regulares; os elementos atrasados também são incluídos nas células-filhas, mas uma proporção considerável é transformada em um ou vários núcleos secundários que são, via de regra, muito menores que o núcleo principal e, portanto, chamados de micronúcleos.

Figura 2. Esquema do mecanismo de formação de micronúcleo em células.



Fonte: Adaptado de AL-SABTI; METCALFE, 1995.

Para identificação dos micronúcleos são considerados todas as pequenas inclusões de material nuclear no citoplasma com as seguintes características: estar

claramente separado do núcleo principal, estar no mesmo foco , ter a mesma cor e até 1/3 do tamanho núcleo (CAVAS; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005).

O teste do micronúcleo consiste na mensuração da frequência de micronúcleos em situações de exposição a ambientes e substâncias com poder genotóxico. Este teste citogenético é um biomarcador capaz de fornecer informações para avaliar lesões cromossômicas oriundas de ações genotóxicas (TOMAZ; FERRI; BOSCHINI-FILHO, 2016). Através deste é possível detectar agentes clastogênicos (promotores de quebras cromossômicas) ou aneugênicos (indutores de aneuploidia ou promotores de segregação cromossômica anormal) (HEDDLE, 1973).

Algumas vantagens fazem este teste se destacar entre os demais, como por exemplo: seu baixo custo, sua rapidez de análise e por ser um procedimento técnico simples (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Ele ainda se sobressai pela sua sensibilidade e precisão para detecção de perda cromossômica (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Segundo Fenech (2000), diferentes tipos de células podem ser utilizados para a realização deste teste, como as vegetais, humanas e de outros mamíferos, com a condição de que essas células sejam capazes de se dividir ou que seja possível induzir essa divisão.

1.3. Biomarcadores em Peixes.

Com o intuito determinar a qualidade de ecossistemas aquáticos, os biomarcadores em peixes vem sendo amplamente utilizados, pois esses organismos representam um grande papel na cadeia alimentar aquática, por carregarem e acumularem energia dos níveis mais baixos aos mais altos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os peixes têm resposta similar a dos vertebrados superiores quando se trata de exposição a agentes tóxicos, o que permite a avaliação de substâncias potencialmente perigosas e posterior comparação dos efeitos para seres humanos (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

Para estimar os efeitos genotóxicos causados pelos poluentes nos peixes, a avaliação das alterações nucleares e dos micronúcleos é amplamente recomendada. Esses testes indicam o dano cromossômico estrutural ou numérico,

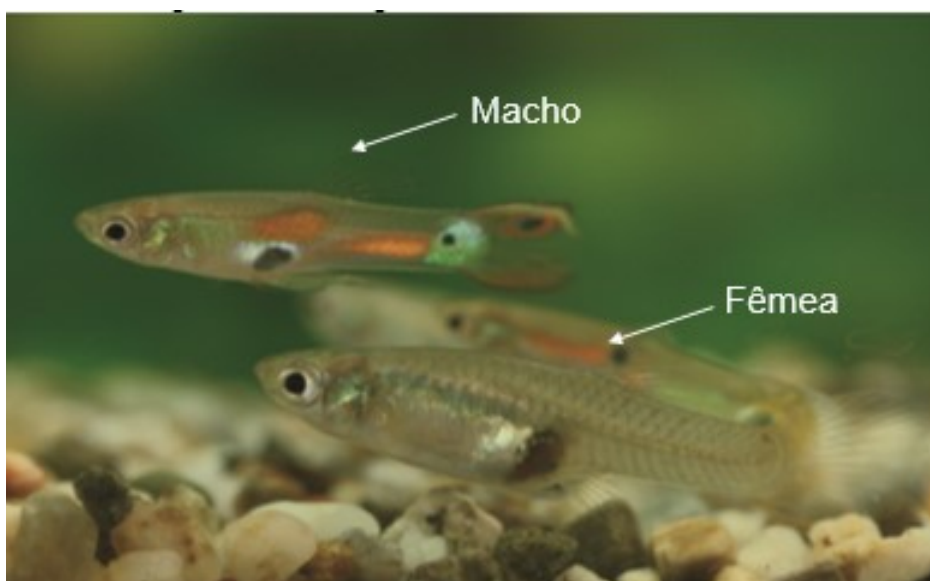
portanto, conseguem avaliar a genotoxicidade (AL-SABTI, 1986). Para Fenech (2000), essas anormalidades estão relacionadas a erros que ocorrem durante a mitose ou meiose, a processos de morte celular e a mutagenicidade e genotoxicidade de contaminantes ambientais.

No teste do micronúcleo é possível utilizar diferentes tipos de células: branquiais, renais, hepáticas e eritrócitos. Sendo que dessas os eritrócitos são os mais utilizados por apresentarem um procedimento mais simples e por evitar a morte dos animais (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

O teste com anormalidades nucleares, além do micronúcleo, em células de peixes expostos a substâncias genotóxicas, pode ser utilizado como complemento ao teste do micronúcleo, pois essas anormalidades são consideradas indicadores de danos genotóxicos (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001).

Poecilia reticulata (Figura 3) é um peixe conhecido popularmente como guppy ou lebiste, pertencente à família Poeciliidae. Guppies são nativos de Trinidad e Tobago, mas foram introduzidos em diversos locais do mundo (incluindo o Brasil) por serem larvófagos e, portanto, atuarem como controle biológico de mosquitos (HOUDE, 1997). Essa espécie é muito utilizada em estudos de toxicidade, pois é altamente susceptível a danos causados por agentes tóxicos (KUMAR; SAHAY; SINHA, 1995).

Figura 3. *Poecilia reticulata*.



Fonte: Adaptado de EVANS; GASPARINI, 2013.

A Organização de Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD) indica os guppies como organismos-teste para estudos de toxicidade e ecotoxicidade, pois apresentam uma ampla distribuição e por serem sensíveis à diversas substâncias tóxicas (OECD, 1992).

1.4. Biomarcadores em *Allium cepa*.

As plantas superiores são excelentes indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos de substâncias químicas ambientais, portanto, os bioensaios realizados com elas são altamente confiáveis, pois têm uma alta sensibilidade para monitoramento e testes de genotoxinas (GRANT, 1999).

Dentre as plantas superiores, *Allium cepa* (cebola) é um organismo-teste comumente utilizado em laboratórios para avaliação de toxicidade (FISKESJÖ, 1988). O teste com *Allium cepa* apresenta muitas vantagens como: rapidez, baixo custo, boas condições para o estudo de danos cromossômicos ou distúrbios da divisão celular, incluindo a avaliação de riscos de aneuploidia (FISKESJÖ, 1985).

A partir deste teste é possível avaliar a toxicidade e a mutagenicidade. A toxicidade é mensurada a partir da observação do crescimento das raízes, já a mutagenicidade é avaliada pela frequência de quebras cromossômicas. A alta sensibilidade deste teste garante a detecção de contaminantes, o que é de extrema importância quando misturas complexas estão sendo avaliadas. Sua sensibilidade está no mesmo nível quando comparada com testes com algas ou linfócitos humanos (FISKESJÖ, 1985).

O Teste de anormalidades cromossômicas com raízes de *Allium cepa* é muito sensível e confiável para análises ambientais, ele é baseado na avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas, por meio do registro da atividade mitótica (índice mitótico) e anormalidades no ciclo celular de células meristemáticas das raízes dessas plantas (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002). Esse teste foi validado em 1991 pelo International Programme of Chemical Safety (IPCS) e o United Nations Environment Programme (UNEP), como um eficiente teste para análise e monitoramento de genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

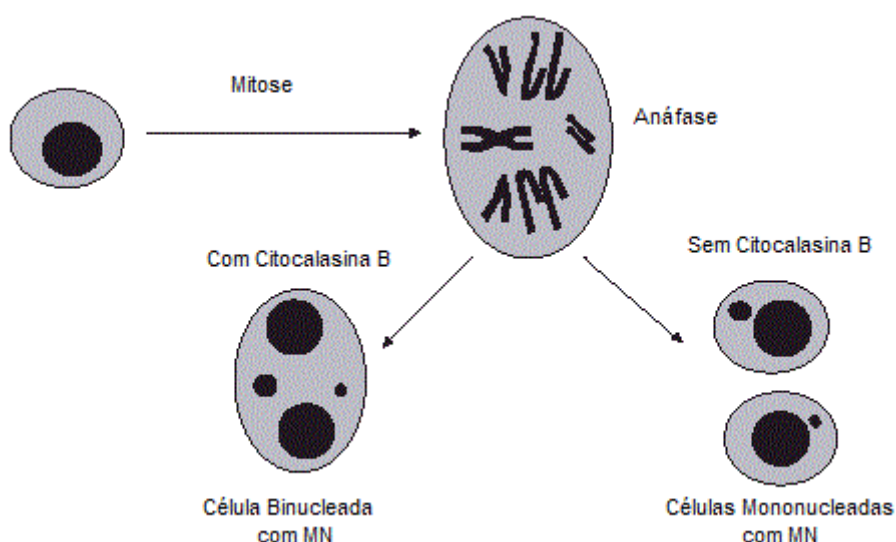
1.5. Biomarcadores em Cultura de Células.

Testes *in vitro* utilizando células de mamíferos são efetivos na detecção de agentes genotóxicos. A aplicação destes com o intuito de avaliar áreas sujeitas à contaminação antrópica, é um modo de diversificar e ampliar os níveis de respostas genotóxicas obtidos por outros tipos de testes (CARDOZO et al., 2006).

De acordo com Reifferscheid et al. (2008), diversos testes citogenéticos *in vitro* estão sendo utilizados para avaliar a genotoxicidade de efluentes industriais, águas de rios e outras misturas complexas para medir seus efeitos na saúde humana. O teste do Micronúcleo *in vitro* é considerado um método prático, robusto e significativo para testar a genotoxicidade de amostras de água.

Várias abordagens foram desenvolvidas para a realização do Teste do MN *in vitro*, uma das mais utilizadas é o Teste do Micronúcleo com bloqueio na citocinese. Essa técnica leva em consideração que as células não se dividem ao mesmo tempo, então apenas as células em divisão serão contabilizadas. Essas células serão identificadas por se apresentarem binucleadas, devido à inibição da citocinese com a utilização da citocalasina B (Figura 4) (FENECH, 2000).

Figura 4. Esquema da ação da Citocalasina B.



Fonte: Adaptado de ZALACAIN; SIERRASESÚMAGA; PATIÑO, 2005.

Outro teste *in vitro* que pode ser utilizado para análise da qualidade de água, é o teste de redução da resazurina que é capaz de indicar a viabilidade celular.

Com este teste é possível indicar, por uma reação de oxidação-redução, a presença de células viáveis, ocorrendo a passagem do estado oxidado, coloração azul não fluorescente (resazurina), para o estado reduzido, coloração rosa altamente fluorescente (resorufina). Este teste possui as seguintes vantagens: possui um protocolo simples, permite uma rápida avaliação da proliferação celular, possui um baixo custo e também permite análises adicionais das células em proliferação (ANSAR AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

1.6. Caracterização da Área de Estudo.

Uberlândia localiza-se no Estado de Minas Gerais, na região do Triângulo Mineiro, aproximadamente na latitude 18° 55' 23" Sul e longitude 48° 17' 19" Oeste. O clima do município é caracterizado por épocas sazonais bem definidas, possuindo um período chuvoso de novembro a março (verão), e um período de seca de maio a setembro (inverno). Possui como vegetação predominante o cerrado (CARRIJO; BACCARO, 2000).

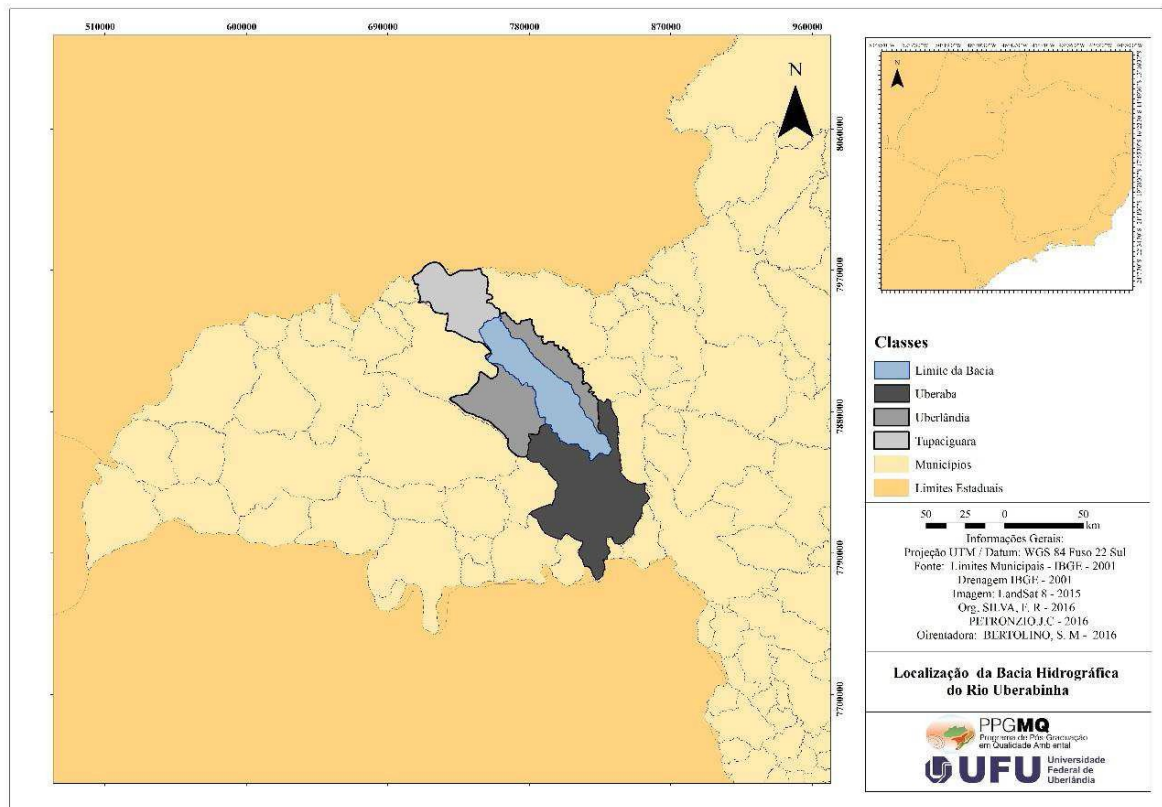
De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população de Uberlândia chega a quase 700 mil habitantes, essa população tem o Rio Uberabinha como principal meio de abastecimento de água (SALLA et al., 2014). A sub-bacia do Rio Uberabinha (Figura 5) abrange terras dos municípios de Uberaba, Uberlândia e Tupaciguara, sendo que o rio nasce no município de Uberaba, atravessa todo o município de Uberlândia, até desaguar no Rio Araguari (FELTRAN-FILHO, 2007).

Quando se analisa as atividades de uso e ocupação de solo nas proximidades do Rio Uberabinha, é possível perceber a forte presença da agropecuária. Devido a isso diversas indústrias foram atraídas para a região, tendo como destaque as indústrias de óleos vegetais, frigoríficos e laticínios (FELTRAN FILHO, 2007).

Além do rio ser afetado pelas atividades agropecuárias e industriais, ele também sofre influência de atividades antrópicas domésticas, pois possui vários efluentes menores, como o Córrego Liso e o Córrego do Óleo, os quais podem apresentar substâncias tóxicas devido à sua proximidade com a área urbana (BRITES; RANTIN, 2004).

A estação de tratamento de esgoto (ETE), é responsável pelo tratamento de 95% do efluente gerado no município de Uberlândia. Devido à elevada densidade populacional, a capacidade de diluição dos poluentes e a autodepuração natural dos cursos de água são comprometidas, em consequência das elevadas demandas de água e dos efluentes lançados (domésticos, industriais e agrícolas). Pelo tratamento dos efluentes não ser totalmente eficiente, juntamente com o fato do Rio Uberabinha ter uma capacidade de diluição reduzida, existe o comprometimento da qualidade da água do rio a jusante do município de Uberlândia (SALLA et al., 2014).

Figura 5. Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Uberabinha.



Fonte: SILVA, 2016.

Desde 1998 o monitoramento deste rio é realizado pelo Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM). Existem dois pontos de monitoramento por esse órgão, um localizado a montante e o outro a jusante da cidade de Uberlândia, e o monitoramento é feito a partir de análises físico-químicas da água (ROSOLEN et al., 2009).

OBJETIVO

1.7. Objetivo Geral

Avaliar a qualidade da água do Rio Uberabinha, em quatro pontos com características distintas, na região urbana da cidade de Uberlândia (MG), por meio de testes *in vivo* e *in vitro* de genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade.

1.8. Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químicos das águas do Rio Uberabinha.
- Analisar o potencial genotóxico das águas do rio a partir dos testes *in vivo* de frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em guppies (*P. reticulata*).
- Determinar a toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade das águas do rio por meio dos testes *in vivo* com *Allium cepa*, em que serão analisados os tamanhos das raízes, o índice mitótico e a frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas.
- Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade utilizando também os testes *in vitro* com cultura de células de mamífero por meio da medição da viabilidade celular e da frequência de micronúcleos, respectivamente.
- Comparar a ação das águas de diferentes pontos do rio sobre os diferentes organismos-teste.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sítios de Estudo e Procedimento de Coleta das Amostras de Água

As amostras de água e as amostras biológicas foram coletadas em quatro pontos distintos (Tabela 1) e (Figura 6), durante o período chuvoso (verão) no Rio Uberabinha em Uberlândia-MG. As amostras de água foram acondicionadas em recipientes próprios para cada análise: frascos de vidro, para as análises físico-químicas; galões de plástico para os testes com *A. cepa* e cultura de células. A amostragem e preservação seguiram a norma ABNT NBR 9898, "Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores" (ABNT, 1987).

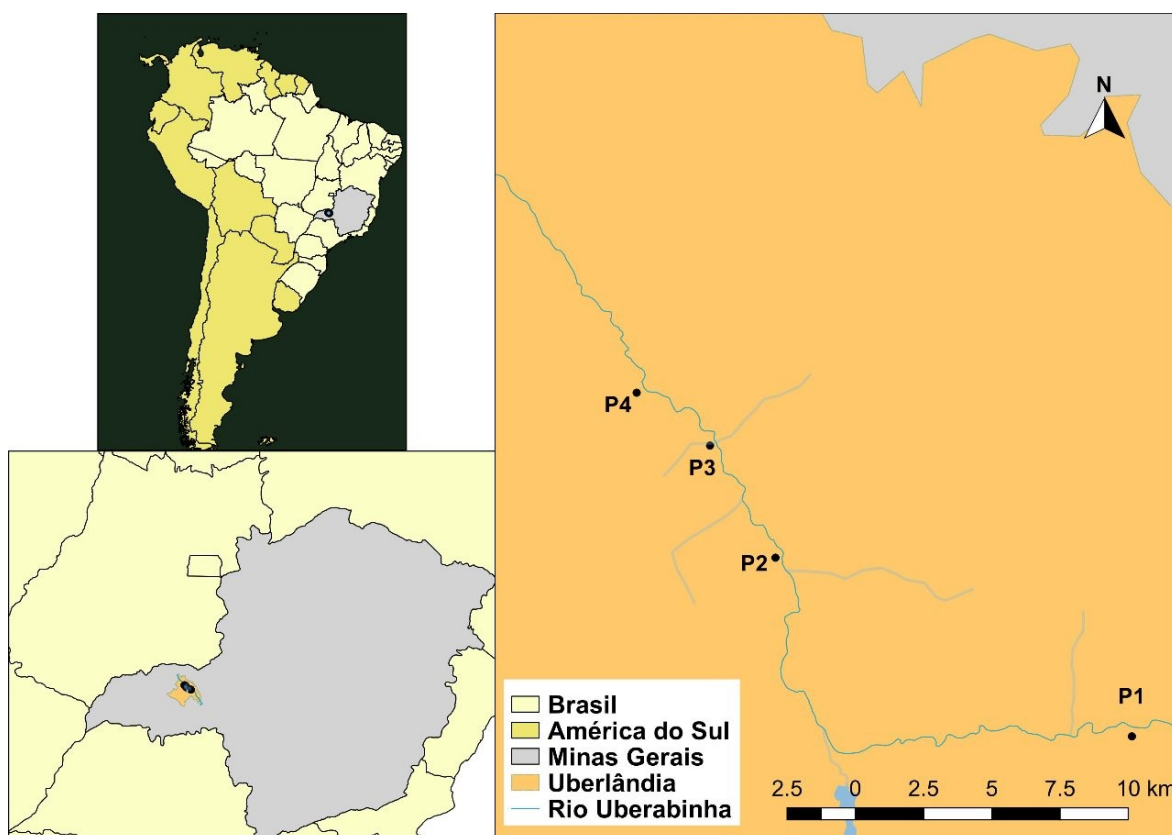
Tabela 1. Coordenadas dos pontos de coleta no Rio Uberabinha.

Pontos	Coordenadas
Ponto 1 (P1)	18°59'16.38"S 48°10'9.38"O
Ponto 2 (P2)	18°55'44.79"S 48°17'35.93"O
Ponto 3 (P3)	18°53'32.08"S 48°18'57.93"O
Ponto 4 (P4)	18°52'29.36"S 48°20'29.84"O

O Ponto 1 está localizado a montante da cidade de Uberlândia, próximo à Estação Renato de Freitas do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Uberlândia (DMAE), onde é realizada a captação e o tratamento de grande parte da água que é distribuída para população de Uberlândia.

O Ponto 2 se situa na área urbana de Uberlândia, depois que o rio passa por alguns bairros da cidade como: Nova Uberlândia, Cidade Jardim, Jardim Colina, Patrimônio e Tubalina, e por dentro de um dos Clubes da cidade.

Figura 6: Mapa evidenciando os pontos de coleta no Rio Uberabinha na cidade de Uberlândia-MG.



Fonte: Autoria própria.

O Ponto 3 se encontra um pouco antes do rio deixar a cidade, no Distrito Industrial, onde estão localizadas diversas indústrias: alimentícias, têxteis metalúrgicas e químicas.

Por fim o Ponto 4 está a jusante da Cidade de Uberlândia, na fazenda Capim Branco, propriedade da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Se localiza depois da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Uberabinha.

2.2. Parâmetros Físico-químicos

Para realizar as análises físico-químicas da água foram feitas coletas das amostras de água de cada um dos quatro pontos, em triplicata, durante a estação chuvosa (verão). Os parâmetros físico-químicos de sólidos suspensos e demanda

bioquímica de oxigênio (DBO) das amostras de água, foram analisados de acordo com os procedimentos relatados por Boyd e Tucker (1992).

A avaliação de outros parâmetros físico-químicos ocorreu sob as diretrizes do guia Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA/WPCF, 1998). As análises de metais tóxicos foram feitas utilizando o espectrômetro de absorção atômica Varian Spectra AA220FS. As soluções de referência de metais tóxicos foram dispostas em ordem de análise, preparadas com 0,9 mol/L de HNO e CFA-C 10% v/v (pH 8.0) (limites de detecção/LOD de 0,001 mg/L). Os resultados das análises foram comparados com os limites estabelecidos pelo guia do 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

2.3. Índice de Qualidade da Água

O cálculo do Índice de Qualidade da Água (IQA) de cada um dos pontos, foi feito de acordo com os parâmetros do Instituto Mineiro de Gestão de Águas (IGAM, 2018a). Os dados foram analisados utilizando um software disponibilizado pelo site do IGAM (2018b). De acordo com os resultados o IQA foi classificado como: excelente ($90 < IQA \leq 100$); bom ($70 < IQA \leq 90$); regular ($50 < IQA \leq 70$); ruim ($25 < IQA \leq 50$) e muito ruim ($0 < IQA \leq 25$).

2.4. Testes com Peixes

Em cada um dos pontos foram coletados 7 guppies (*P. reticulata*) machos adultos, utilizando redes de mão. Para a realização dos testes foi seguido o protocolo 119/17, enviado para a Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), de acordo com a técnica desenvolvida por Pereira e De Campos Junior (2015). Para obter os eritrócitos, as brânquias foram centrifugadas em soro fetal bovino (800x por 5 minutos).

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 1000x), foram identificadas as frequências de anormalidades nucleares (AN) e de micronúcleos

(MN). As AN consideradas foram células: binucleadas, lobadas, segmentadas ou em forma de rim. A frequência de AN foi determinada pela soma dessas anormalidades, com exceção dos MN's que foram analisados separadamente.

Devido ao fato que no Ponto 1 a espécie *Poecilia reticulata* não foi encontrada, somente nesse ponto a espécie analisada foi *Phalloceros caudimaculatus*. Apesar das duas espécies pertencerem à mesma família (Poeciliidae), foi realizado um estudo para confirmar se os testes genotóxicos apresentam resultados similares. Para isso foi escolhida uma represa (RP) localizada na latitude 18°53'34.83"S e longitude 48° 8'34.81"O, onde ambas espécies foram encontradas, sendo assim, para realizar este teste o mesmo protocolo foi utilizado. Esta represa também foi considerada como ponto de referência, e foi realizada a análise dos parâmetros físico-químicos da água.

2.5. Testes com *Allium cepa*

Para a realização deste estudo foi utilizado o protocolo estabelecido por Fiskesjö (1985) com adaptações. As cebolas foram adquiridas de uma mesma fonte comercial, as raízes secas foram retiradas e os bulbos de cebola foram colocados para enraizar em frascos com água à temperatura ambiente e no escuro por 24 horas.

Em seguida esses bulbos foram colocados por 72 horas nos tratamentos: P1, P2, P3 e P4 nas concentrações 100%, 50% e 25% e nos controles negativo (água destilada) e positivo (paracetamol 400mg/L). Foram utilizadas 5 cebolas para cada tratamento.

Após o tempo de tratamento, foram retiradas as 6 maiores raízes de cada cebola, que foram medidas com o auxílio de um paquímetro. Em seguida essas raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol : ácido acético) sendo mantidas em temperatura ambiente, e 24 horas depois foram colocadas em álcool 70% a - 6°C.

Para a confecção das lâminas foram utilizadas duas raízes de cada cebola. As raízes foram lavadas em água destilada por 5 minutos três vezes, depois foram hidrolisadas em HCl 5N por 3 min e por fim foram enxaguadas com água destilada. As raízes foram colocadas em lâminas com uma gota de ácido acético 45%, com o auxílio de uma lupa, a coifa foi retirada, e a parte das raízes utilizada foi a região

contendo as células meristemáticas. Essa região foi fragmentada, e uma lamínula foi colocada para separar ainda mais as células. A retirada da lamínula foi feita utilizando nitrogênio líquido.

As lâminas foram coradas com o fluorocromo Hoechst 33258. A análise destas foi feita utilizando um microscópio de fluorescência com objetiva de 40x. Foram analisadas 1000 células por bulbo, totalizando 5000 células por tratamento.

O índice mitótico foi calculado pela razão do número de células em divisão pelo número total de células analisadas, multiplicado por 100. A frequência de células micronucleadas foi estimada observando 1000 células na intérfase por bulbo. Já as anormalidades cromossômicas (AC) foram apresentadas como um número total de anormalidades em 100 células em divisão (excluindo a prófase) por cebola. Foram consideradas anormalidades cromossômicas: fragmentos cromossômicos, cromossomos atrasados e pontes.

2.6. Testes com Cultura de Células

A linhagem celular escolhida foi a mioblasto (C2C12), que é uma linhagem subclone da linhagem celular murina C2. Esses mioblastos consistem em uma população de células miogênicas que têm a capacidade de proliferarem e diferenciarem rapidamente *in vitro* (BURATTINI et al., 2004; GRABOWSKA et al., 2011).

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

A linhagem celular (1×10^4 cels/poço) foi incubada em 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 completo em uma microplaca estéril de 96 poços. Posteriormente as células foram tratadas com meio contendo as amostras de água P1, P2, P3 e P4 nas concentrações 100%, 75%, 50%, e 25% e foram feitos os controles: negativo com água destilada e positivo com mitomicina (1µL/mL), todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata. A microplaca foi incubada a 37°C com 5 % de CO₂, por 24 horas.

Para avaliar a viabilidade celular foi feito o teste de redução da resazurina. Após 20 horas de tratamento, em cada poço foi adicionado 20µL de resazurina (10%), depois de 4 horas de incubação a leitura da placa foi realizada em um espectrofotômetro a 570nm. A porcentagem de viabilidade celular é obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular} = [(AE-CP) / (CN-CP)] * 100$$

Em que:

AE = absorbância nos poços tratados;

CP = absorbância nos poços contendo apenas meio de cultura;

CN = absorbância nos poços contendo controle negativo (meio de cultura contendo células);

Foi realizada a repetição deste ensaio.

Na continuidade, para a realização da análise de genotoxicidade a partir do teste do micronúcleo, foi seguido o protocolo OECD 487 (OECD, 2012), com algumas modificações. Para isto foram selecionadas apenas 3 concentrações dos tratamentos (100%, 50% e 25%), as quais apresentaram viabilidade celular acima de 70%, aonde o sobrenadante foi retirado e a citocalasina B (5 µg mL⁻¹) foi adicionada e mantida por mais 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram fixadas com formol 10 % diluído em PBS 1x. As células foram incubadas a 4°C overnight. Para remover o fixador foi adicionado PBS 1x e posteriormente foi adicionado o fluorocromo Hoechst 33342 (0,9 mg mL⁻¹) na concentração de 5 µM, com intuito de marcar o DNA da célula, sendo incubada por 20 min em 37°C no escuro. Logo após foi adicionado PBS 1x e por fim foi adicionado à solução de montagem (Na₂HPO₄ 0,2 M em PBS 1x). As imagens foram capturadas no microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA). Para analisar a frequência de micronúcleos, foram contadas 2000 células binucleadas por concentração e apenas os micronúcleos presentes em células binucleadas foram considerados.

2.7. Análise Estatística

Os testes com peixes foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas Tukey, utilizando o software GraphPad Prism 7.0. Com o mesmo software as análises estatísticas dos testes com *Allium cepa* e cultura celular foram feitas utilizando two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunnett. O cálculo da viabilidade celular no teste com cultura de células foi feito utilizando o mesmo software, a partir de uma regressão não linear, que relaciona o percentual de viabilidade celular em função do logaritmo das diferentes concentrações de água testadas, admitindo-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros Físico-químicos e Índice de Qualidade de Água

O CONAMA (2005) classifica os corpos de água segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, as águas doces possuem cinco classes distintas: classe especial, classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4 (Tabela 2). Os padrões de qualidade estabelecem limites individuais para cada substância, em cada uma das classes. Neste trabalho os parâmetros físico-químicos foram avaliados com base nos níveis permitidos para águas doces de classe 2, devido as atividades que são realizadas nas regiões em que foram feitas as análises.

O resultado da análise dos parâmetros físico-químicos das amostras de água dos 4 pontos de coleta do Rio Uberabinha (P1, P2, P3 e P4) e do ponto na represa (RP) estão dispostos na Tabela 3. Como as análises foram realizadas em triplicata, o resultado representa a média \pm o desvio padrão desses dados.

Nos pontos P1 e RP, nenhum dos parâmetros analisados ultrapassou, ou ficou abaixo, dos limites estabelecidos pelo CONAMA (2005) para corpos de água classe 2. Inclusive os seus limites se enquadram na classe 1, que representa um nível em que as águas doces apresentam uma melhor qualidade, em comparação com a classe 2.

Tabela 2: Classes de água doce e seus usos de acordo com a resolução do CONAMA 357/2005.

Classificação	Usos
Classe especial	Abastecimento para consumo humano, com desinfecção; à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
Classe 1	Abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme a resolução CONAMA nº 274, de 2000; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.
Classe 2	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme resolução CONAMA nº 274, de 2000; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto e à aquicultura e à atividade de pesca.
Classe 3	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário e à dessedentação de animais.
Classe 4	Navegação e harmonia paisagística.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta do Rio Uberabinha. Os dados representam a média \pm o erro padrão de 3 replicatas. * Valores acima dos níveis determinados pelo CONAMA (2005) para águas doce de classe 2. ** Valores abaixo dos níveis determinados pelo CONAMA (2005) para águas doce de classe 2. ND = parâmetro não detectado.

Parâmetros	Unidades	Sítios de Estudo				
		P1 (Média \pm SD)	P2 (Média \pm SD)	P3 (Média \pm SD)	P4 (Média \pm SD)	RP (Média \pm SD)
Oxigênio Dissolvido	(mg/L)	7.40 \pm 0.10	5.60 \pm 0.40	3.03. \pm 0.15**	6.13 \pm 0.15	6.97 \pm 0.06
Cloretos	(mg/L)	2.07 \pm 0.10	15.87 \pm 0.31	10.98 \pm 0.24	7.88 \pm 0.39	1.08 \pm 0.06
Coliformes fecais	(NMP/100mL)	19.67 \pm 4.93	759.67 \pm 131.05	1016.33 \pm 112.86*	231.67 \pm 33.50	31 \pm 3.61
pH		6.80 \pm 0.00	6.43 \pm 0.15	5.97 \pm 0.06**	6.27 \pm 0.12	6.87 \pm 0.06
DBO	(mg/L)	1.13 \pm 0.06	6.63 \pm 0.25*	9.53 \pm 0.65*	6.30 \pm 0.26*	0.97 \pm 0.06
Nitratos	(mg/L)	0.58 \pm 0.08	2.90 \pm 0.12	4.51 \pm 0.24	3.47 \pm 0.18	0.96 \pm 0.07
Nitritos	(mg/L)	ND	0.02 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	ND
Fósforo Total	(mg/L)	ND	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	ND
Turbidez	(UNT)	6.43 \pm 0.15	101.43 \pm 2.49*	150.63 \pm 1.91*	22.27 \pm 2.44	18.23 \pm 1.46
Sólidos totais	(mg/L)	57.23 \pm 11.93	531.6 \pm 48.54*	943.07 \pm 106.68*	109.4 \pm 12.20	75.70 \pm 6.97
Nitrogênio Amoniacal	(mg/L)	0.71 \pm 0.09	3.49 \pm 0.06	5.56 \pm 0.23*	3.94 \pm 0.26*	1.11 \pm 0.03
Arsênio	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Bário	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Cádmio	(mg/L)	ND	0.02 \pm 0.00*	0.11 \pm 0.02*	ND	ND
Chumbo	(mg/L)	ND	ND	0.06 \pm 0.00*	0.01 \pm 0.00*	ND
Cianeto	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Cobre	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Cromo	(mg/L)	ND	0.013 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	ND
Fenólicos totais	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Mercúrio	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Zinco	(mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND

No ponto P2 os níveis de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), turbidez, sólidos totais e cádmio, estão acima do indicado para águas doces de classe 2. Esses parâmetros que estão acima dos limites, relacionam-se com os tipos de efluentes que o rio recebe até este ponto (agrícolas e domésticos).

A Demanda Bioquímica de Oxigênio é um método indireto para a quantificação da matéria orgânica, ou do seu potencial poluidor. Com essa técnica é possível medir a quantidade de oxigênio necessário para consumir a matéria orgânica contida na água. Portanto, se os níveis da DBO estão altos, significa que existe uma grande quantidade de matéria orgânica naquela amostra. A matéria orgânica é uma das principais causadoras do problema de poluição das águas (VON SPERLING, 2005).

A turbidez representa o grau de interferência à passagem da luz através do líquido. Sua elevada taxa pode reduzir a penetração da luz, reduzindo a fotossíntese, o que afeta as comunidades biológicas aquáticas. Despejos domésticos e indústrias são responsáveis por aumentarem o seu nível (VON SPERLING, 2005).

Sólidos totais dissolvidos (STD) é a soma de todos os constituintes químicos dissolvidos em água, sendo assim, é utilizado como um indicador agregado da presença de produtos químicos contaminantes, suas elevadas concentrações podem ser prejudiciais à vida aquática. As fontes primárias de STD são agrícolas e residenciais (PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011).

O cádmio é um metal muito tóxico, que mesmo em baixas concentrações, confere à água características tóxicas, isso ocorre devido a sua habilidade de formar complexos com substâncias orgânicas. Além disso, assim como outros metais, o cádmio se acumula no ambiente aquático, aumentando sua concentração na biomassa de organismos, à medida que se evolui na cadeia alimentar (fenômeno da biomagnificação) (FUNASA, 2014). Já se sabe que o cádmio apresenta efeito genotóxico, o que reforça a preocupação com a emissão do mesmo em águas. Essa emissão pode ser originada por atividades industriais, agrícolas e urbanas (SOUZA, 2016).

Como o ponto P2, o P3 também apresentou índices elevados para DBO, turbidez, sólidos totais e cádmio, só que com valores ainda mais altos. Mas além disso, também apresentou valores maiores que os limites para coliformes fecais,

nitrogênio amoniacal e chumbo, e menores que o limite para oxigênio dissolvido e pH. Esses resultados indicam a grande presença de matéria orgânica e metais pesados, provenientes de efluentes domésticos e industriais.

Coliforme é um grupo de bactérias que habita normalmente o intestino de homens e animais, portanto, o índice de coliformes fecais, indica a contaminação de uma amostra de água por fezes. Quanto maior for a quantidade de coliformes, maior é a probabilidade de que haja contaminação por organismos patogênicos. Sua presença em grandes quantidades é um indicativo da presença de efluentes domésticos (FUNASA, 2014).

Os processos de conversão do nitrogênio têm implicações na operação das estações de tratamento de esgotos, em termo de consumo de oxigênio, consumo de alcalinidade e sedimentabilidade do lodo. O nitrogênio amoniacal é diretamente tóxico aos peixes (VON SPERLING, 2005).

O chumbo é um metal pesado e é um dos principais poluentes dos meios aquáticos e terrestres. Ele é considerado pela International Agency for Research on Cancer (IARC) uma substância carcinogênica. Mesmo em baixas concentrações pode interferir em diversas partes do metabolismo, e assim como o cádmio, apresenta o fenômeno da biomagnificação. Frequentemente é encontrado em águas residuárias industriais (IARC, 2006; SOUZA, 2016).

O oxigênio dissolvido é um componente essencial para os seres vivos, a sua redução pode provocar mortandade dos organismos aeróbicos, solubilização de diversos compostos químicos de presença indesejável e aumento na toxicidade de vários elementos. Quanto maior for a quantidade de matéria orgânica, menor será a quantidade de oxigênio dissolvido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011).

O potencial hidrogeniônico (pH) é um indicativo da condição de acidez, neutralidade ou alcalinidade da água. A sua variação influencia no equilíbrio de compostos químicos. Valores baixos podem ser indicativos da presença de efluentes industriais (VON SPERLING, 2005).

Por fim, o ponto P4 apresentou alterações nos parâmetros DBO, nitrogênio amoniacal e chumbo, o que confirma a presença de matéria orgânica e metais pesados acima do limite, mesmo depois de realizado o tratamento da água.

Uma análise qualitativa das amostras de água foi feita de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo IGAM (Tabela 4), onde são analisados os 9 parâmetros considerados mais representativos para a caracterização da qualidade das águas: oxigênio dissolvido, coliformes termotolerantes, pH, demanda bioquímica de oxigênio, nitrato, fosfato total, variação da temperatura da água, turbidez e sólidos totais. Os pontos P1 e RP foram classificados como excelente, e por isso foram considerados como pontos de referência. Os pontos P2 e P3 foram classificados como ruim, ou seja, são as amostras com pior qualidade de água. Já o ponto P4 foi classificado como regular.

Tabela 4: Resultados da avaliação do IQA dos pontos do Rio Uberabinha e da Represa.

Pontos	Valores IQA	Classificação
Ponto 1 (P1)	84.7	Excelente
Ponto 2 (P2)	43.7	Ruim
Ponto 3 (P3)	32.9	Ruim
Ponto 4 (P4)	60.9	Regular
Represa (RP)	81.0	Excelente

3.2. Testes com Peixes

Foi realizado o teste do MN com peixes coletados nos pontos amostrais, afim de avaliar o potencial genotóxico desses locais (Figuras 7 e 8). Os resultados com os peixes *Poecilia reticulata* e *Phalloceros caudimaculatus* coletados na mesma represa (ponto RP), não apresentaram diferença estatística quanto a frequência de micronúcleos nas duas espécies. Isso significa que é possível comparar os resultados obtidos no ponto P1, com *Phalloceros caudimaculatus*, com os resultados dos outros pontos, onde o teste foi realizado com *Poecilia reticulata*.

Foram considerados como referência os peixes *P. reticulata* coletados na represa (RP *P. reticulata*). Os pontos P1 e P4 não apresentaram diferença significativa quando comparados com o ponto de referência. Isso significa que esses pontos não apresentam uma ação genotóxica nessa espécie de peixe.

Figura 7: Imagem representativa de micronúcleo encontrado em eritrócito de *Poecilia reticulata*.

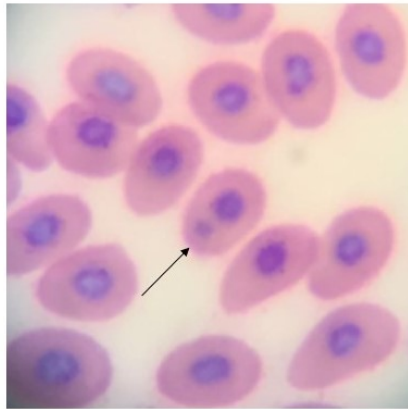
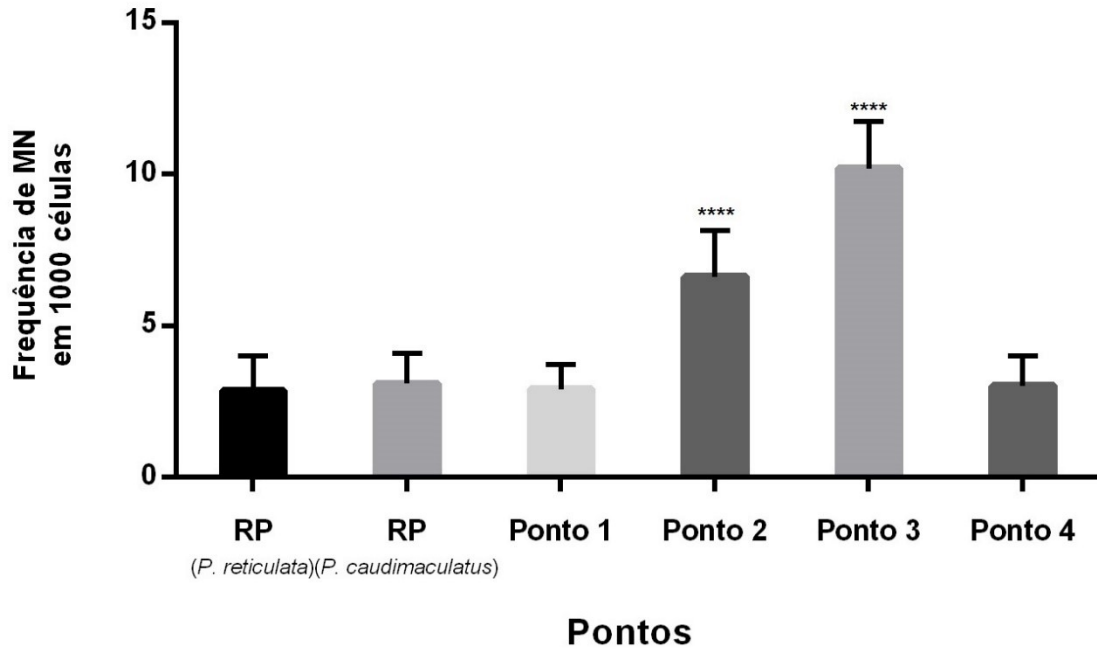


Figura 8: Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em eritrócitos de peixes de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ [comparando com o ponto de referência (RP *P. reticulata*)].



Já os pontos P2 e P3 apresentaram uma diferença estatística com significância de 0.0001, isso indica a alta genotoxicidade dessas amostras de água para esses organismos. Bolognesi e Hayachi (2011), descrevem a frequência de micronúcleos em peixes de água doce como um biomarcador capaz de identificar danos genotóxicos que podem ser causados por: descargas urbanas ou industriais, metais pesados e pesticidas

Ao analisar os resultados da frequência de AN (Tabela 5), é possível perceber que os pontos P2 e P3 continuam apresentando resultados significativos quando comparados ao ponto de referência (*P. reticulata*), o que corrobora com os dados da análise de frequência de MN.

Tabela 5: 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 ponto de referência (*P. reticulata*)].

Pontos	Binucleada	Lobada	Segmentada	Forma de rim
RP (<i>P. reticulata</i>)	4 \pm 1.3	2 \pm 1.1	1 \pm 0.8	1 \pm 0.7
RP (<i>P. caudimaculatus</i>)	4 \pm 1.2	2 \pm 0.8	2 \pm 0.8	1 \pm 0.6
Ponto 1	4 \pm 0.8	2 \pm 0.9	2 \pm 0.9	2 \pm 0.7*
Ponto 2	14 \pm 2.6****	17 \pm 3.2****	5 \pm 1.4****	6 \pm 1.3****
Ponto 3	18 \pm 2.0****	30 \pm 2.8****	6 \pm 1.3****	8 \pm 1.7****
Ponto 4	7 \pm 1.9****	2 \pm 0.7	2 \pm 1.0	2 \pm 1.1**

Foram observadas algumas alterações na frequência de AN que não estiveram presentes nos testes com MN. P4 apresentou uma maior frequência de células binucleadas e em forma de rim, quando comparado ao ponto de referência, e o ponto P1 apresentou um pequeno aumento na frequência de células em forma de rim. Ayllon e Garcia-Vazquez (2000) sugerem utilizar a análise de anormalidades nucleares (AN) para investigar a genotoxicidade, além da análise de micronúcleos, pois algumas vezes as AN são induzidas, até mesmo quando não há a presença de MN.

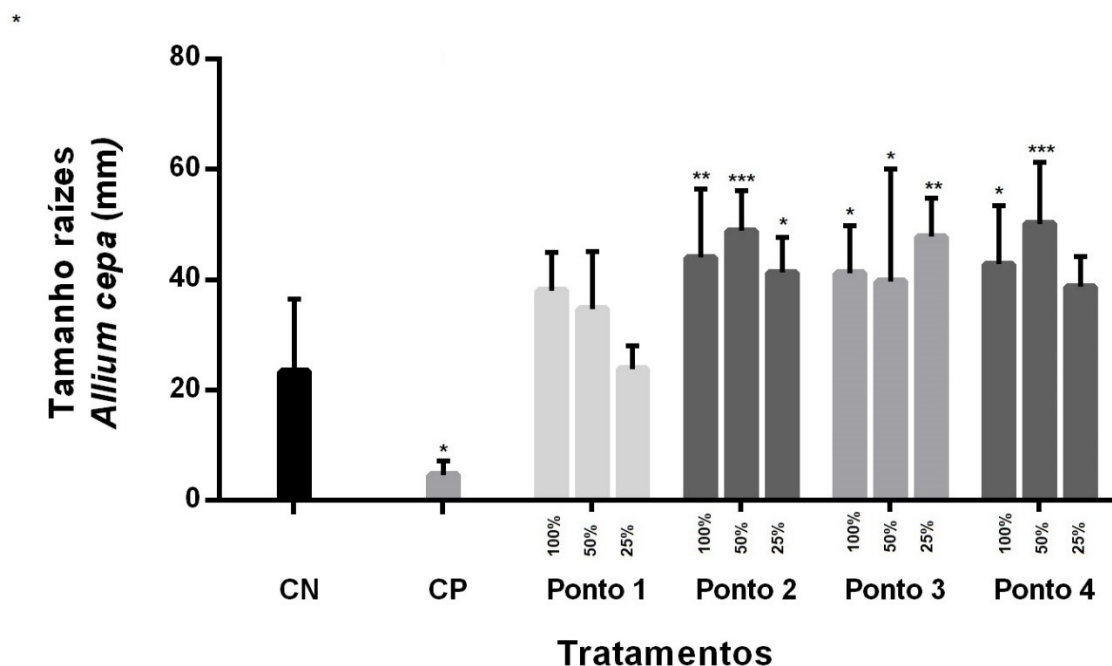
A partir dessas análises de MN e AN é perceptível a ação genotóxica que os pontos P2 e P3 exercem sobre os peixes *P. reticulata*. P4 apresenta uma pequena genotoxicidade, e P1 não é genotóxico para esses indivíduos. Os peixes são

considerados bons organismos para análise de genotoxicidade, pois têm a capacidade de acumular poluentes diretamente da água contaminada ou indiretamente através da ingestão de organismos aquáticos contaminados. Sendo assim, poluentes genotóxicos podem levar à contaminação não só dos próprios organismos aquáticos, mas de todo o ecossistema, incluindo os seres humanos, através da cadeia alimentar (MATSUMOTO et al., 2006).

3.3. Testes com *Allium cepa*

A partir da análise do resultado dos tamanhos das raízes de *Allium cepa* (Figura 9), é possível avaliar a toxicidade das amostras de água. É possível perceber que no controle positivo com paracetamol (CP), em comparação com o controle negativo com água destilada (CN), houve uma inibição do crescimento radicular, o que evidencia a toxicidade do paracetamol.

Figura 9: Gráfico representativo das taxas de crescimento das raízes 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).



O ponto P1 não apresentou diferença significativa em comparação com o CN. Em contrapartida, todos os outros pontos (P2, P3 e P4) apresentaram um aumento significativo no crescimento radicular. Esse aumento indica que essas amostras não apresentam efeito tóxico para esses organismos, mas evidencia uma grande presença de matéria orgânica, advinda principalmente do esgoto doméstico (FERREIRA et al., 2012).

O Índice Mitótico (IM) é utilizado para avaliar a porcentagem de células na divisão celular (Figura 10). Com esse índice também é possível avaliar a taxa de citotoxicidade das amostras de água, a partir da redução deste. Quando o IM possui um valor menor que o controle negativo, pode indicar alterações provenientes da ação de substâncias químicas no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos, agora quando o IM é maior indica um aumento na divisão celular, o que pode levar à proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de tumores (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os resultados do IM (Figura 11), apontam que os pontos P2 e P4 tiveram uma redução significativa nos seus índices mitóticos, em comparação com o controle negativo. Além disso, os seus índices tiveram valores bem próximos ao do controle positivo. Esses resultados indicam que esses pontos possuem uma grande atividade citotóxica.

Figura 10: Representação de células meristemáticas de *Allium cepa*, durante a divisão celular. (A) Prófase. (B) Metáfase. (C) Anáfase. (D) Telófase.

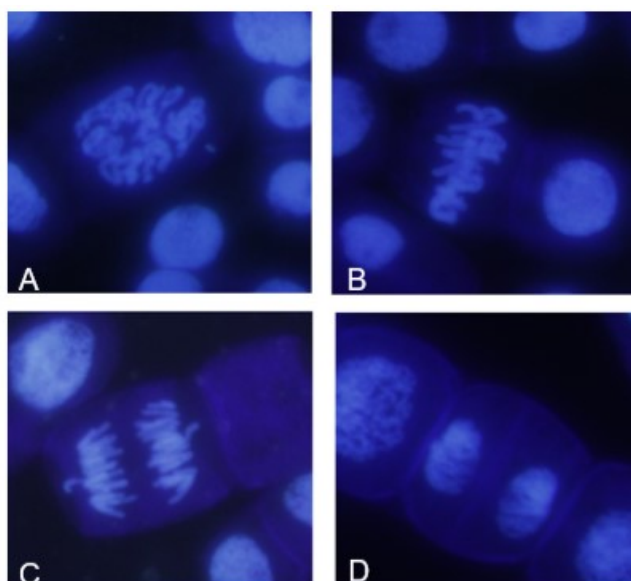
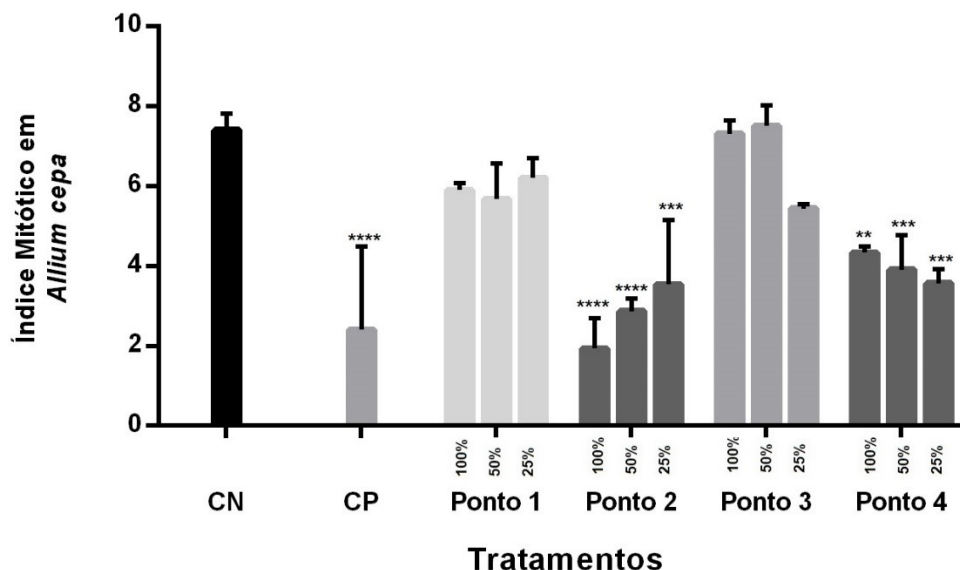


Figura 11: Gráfico representativo do Índice Mitótico encontrado nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo).



Na avaliação do potencial genotóxico em *Allium cepa* avaliou-se as anormalidades cromossômicas (AC) e a frequência de micronúcleos (MN). Considerou-se a somatória das seguintes anormalidades cromossômicas: fragmentos cromossômicos, cromossomos atrasados e pontes (Figura 12). Já o resultado da frequência de MN foi analisado separadamente. As AC são consideradas um bioindicador eficiente na investigação do potencial genotóxico, pois fornecem informações importantes que devem ser consideradas na avaliação ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Segundo os mesmos autores os fragmentos cromossômicos e as pontes são indicadores de uma ação clastogênica, enquanto o cromossomo atrasado indica uma ação aneugênica. Nos resultados das AC (Figura 13), é possível perceber que apenas o controle positivo e o ponto P3, nas concentrações 100% e 50%, tiveram um aumento significativo na frequência de AC em relação ao controle negativo.

Figura 12: Representação de células meristemáticas de *Allium cepa* apresentando anormalidades. (A) Micronúcleo. (B) Fragmento cromossômico. (C) Ponte. (D) Cromossomo atrasado.

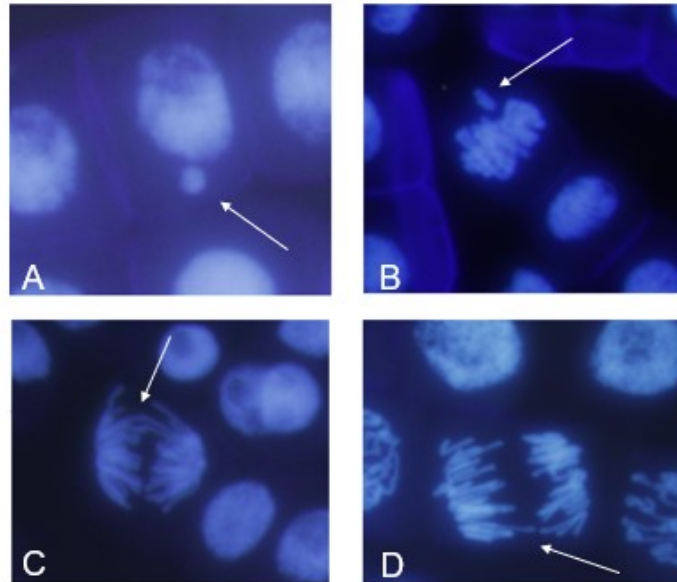
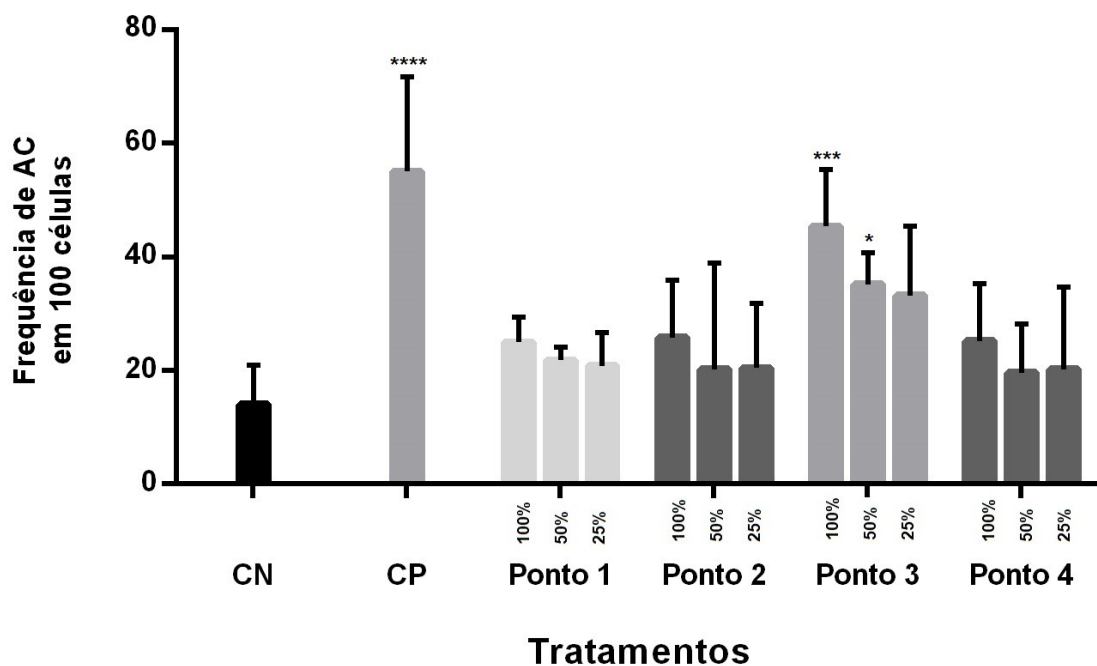
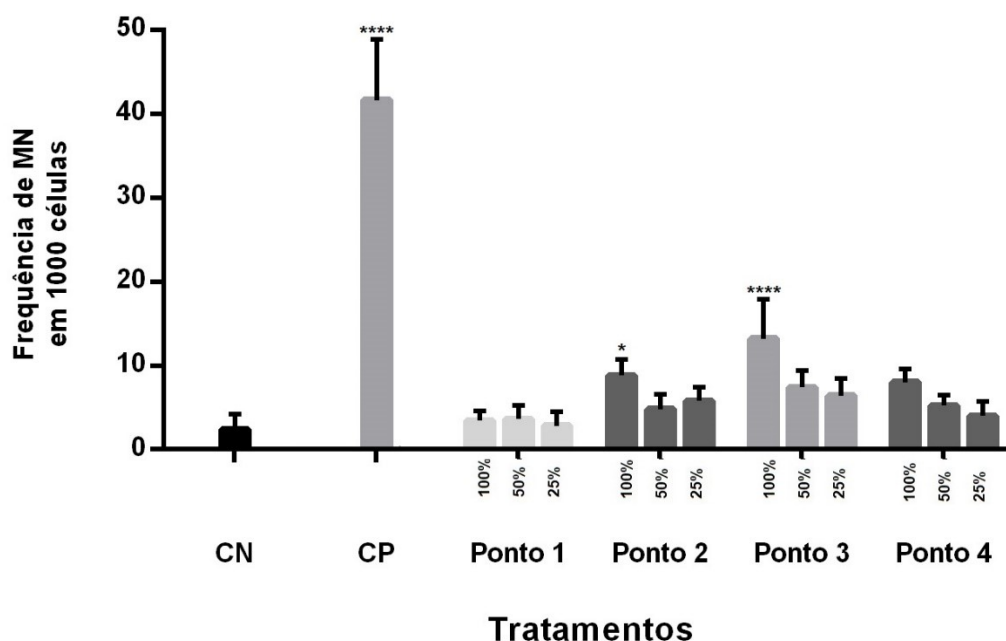


Figura 13: Gráfico representativo da frequência de anormalidades cromossômicas encontradas nas células meristemáticas de *A. cepa* de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (comparando com o controle negativo).



Para completar a avaliação do potencial genotóxico destas amostras de água em *A. cepa*, também foi analisada a frequência de MN em células meristemáticas (Figura 14). O ponto P3, somente na concentração 100%, foi o que apresentou a maior diferença na frequência de MN em comparação ao controle negativo, tendo como significância $p < 0.0001$. Outro ponto que apresentou diferença significativa foi o P2 100%, mas com uma significância bem menor.

Figura 14: 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).

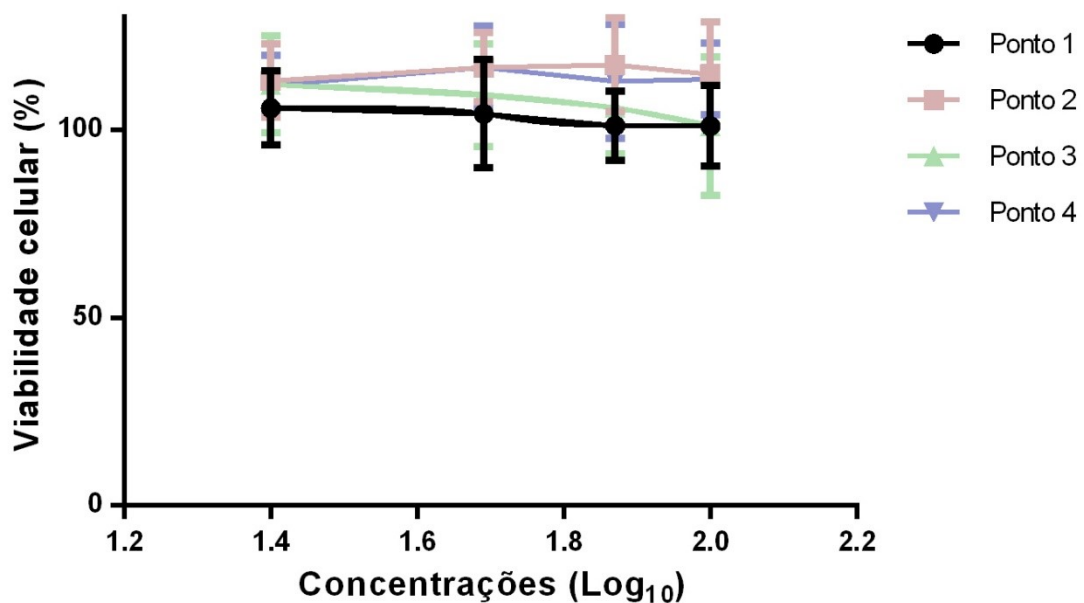


De uma maneira geral, os testes com *A. cepa* indicaram uma citotoxicidade nos pontos P2 e P4, e genotoxicidade nos pontos P2 e P3, mas somente nas concentrações 100%. Para Leme e Marin-Morales (2009), o teste com *A. cepa* é um ensaio rápido e sensível na detecção agentes genotóxicos e mutagênicos ambientais. Portanto este teste representa um importante método para triagem de contaminantes ambientes e seus mecanismos de ação, podendo ser utilizado como alerta para outros sistemas teste.

3.4. Testes com Cultura de Células

Com o intuito de analisar o potencial citotóxico das amostras de água dos 4 pontos do Rio Uberabinha, a linhagem C2C12 foi tratada por 24 horas com cada uma destas, então a viabilidade celular foi avaliada através do teste de redução da resazurina. A partir dos dados obtidos (Figura 15), é possível perceber que em nenhum dos tratamentos a viabilidade celular diminuiu. Esse teste indica que nenhuma das amostras de água foi citotóxica para linhagem C2C12.

Figura 15: 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.



Já a genotoxicidade foi avaliada pelo teste do MN (Figura 16). Foi feita a quantificação de MN em 1000 células binucleadas. Testes com células de mamíferos são importantes, pois são bons em identificar agentes genotóxicos. A aplicação destes na avaliação da qualidade da água, amplia os níveis de respostas genotóxicas obtidos por testes com outros organismos (CARDOZO et al., 2006).

Nos resultados (Figura 17) é possível observar o grande aumento na frequência de MN do controle positivo com mitomicina (CP), em relação ao controle negativo (CN). Os resultados de P1 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo. P2 exibiu um aumento na frequência de MN apenas na concentração 100%, com significância de 0.05.

Os pontos P3 e P4, tiveram um aumento na frequência de MN, com relação ao controle negativo, em suas concentrações 100% e 50%. De todos P3 100% foi o tratamento que apresentou a maior frequência de MN, obtendo valor em próximo ao do controle positivo.

Figura 16: Imagem representativa de micronúcleo encontrado em célula C2C12 binucleada.

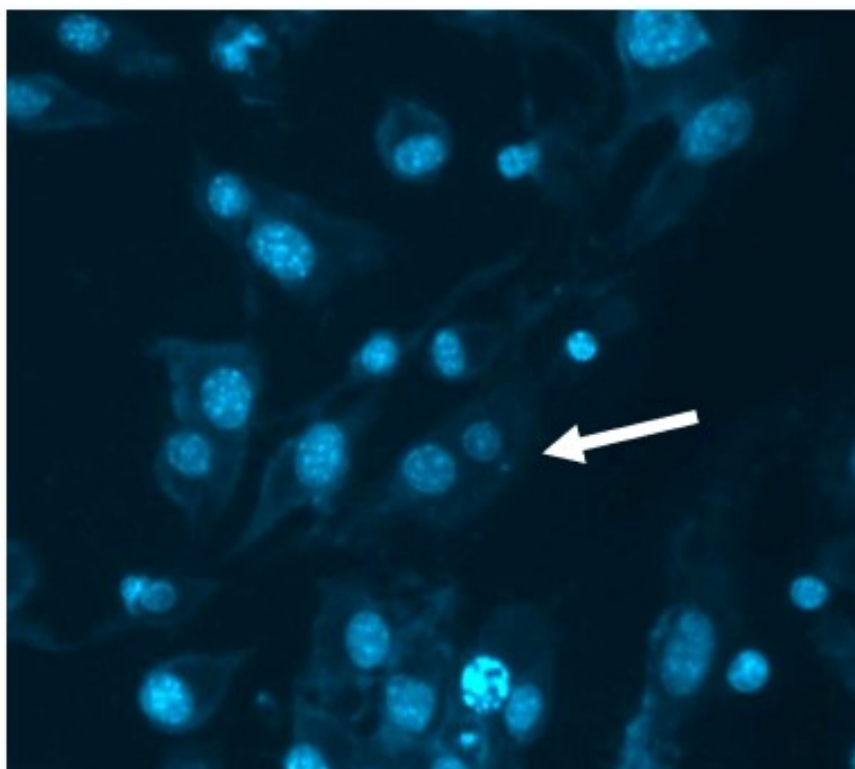
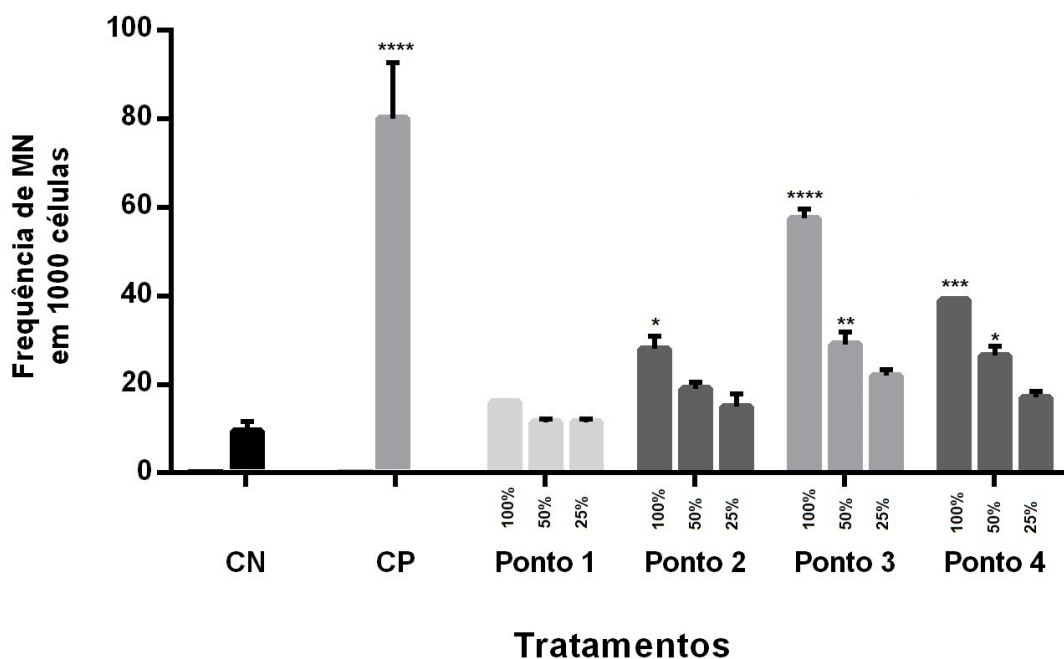


Figura 17: Gráfico representativo da frequência de micronúcleos encontrada em células C2C12 de acordo com cada ponto de coleta. Os dados representam a média \pm o erro padrão. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparando com o controle negativo).



Os testes com cultura de C2C12, indicam que nenhum dos pontos amostrais são citotóxicos. Já os testes com MN apontam uma alta genotoxicidade para os pontos P3 e P4, mas apenas nas concentrações 100% e 50%. O ponto P2 apresentou uma pequena genotoxicidade na sua concentração 100%.

3.5. Análise comparativa dos testes

Para avaliar a qualidade da água com maior segurança, é fundamental a utilização de organismos representantes de diferentes níveis tróficos. Dessa maneira, uma maior gama de substâncias presentes em uma amostra de efluentes poderá ser detectada, devido à diferente sensibilidade dos organismos (DIETZ et al., 2000). Por esse motivo foram escolhidos para este trabalho três organismos de níveis tróficos diferentes: *Allium cepa*, *Poecilia reticulada* e uma linhagem celular de mamíferos (C2C12).

Outro aspecto importante é que com a utilização da diluição das amostras de água, se tornam mais claros os impactos de toxicidade desta, envolvendo os efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade que as diferentes concentrações podem apresentar (GUIMARÃES; LACAVA; MAGALHÃES, 2004). Neste estudo ficou evidente a diferença de resultados de acordo com cada uma das concentrações, sobretudo as amostras de água de todos os pontos na concentração 25% não apresentaram efeito genotóxico.

De uma maneira geral, os resultados obtidos nos testes com cada um dos diferentes organismos, foram similares. Mas ocorreram algumas exceções, evidenciando a diferente sensibilidade que esses organismos apresentam em frente aos tratamentos com substâncias diferentes.

Na análise físico-química o ponto P1 apresentou o melhor IQA, com pontuação de 84,7, o que o classificou como “Excelente”. Todas as outras análises ecotoxicológicas corroboram com essa classificação, pois nos testes nenhum biomarcador apresentou resultados significativamente diferentes dos controles negativos. Esses resultados eram esperados, visto que neste ponto, o rio ainda não recebe a descarga de efluentes domésticos e industriais.

P2 que foi classificado como “Ruim”, já apresentou algumas divergências em seus testes. Foi observada sua ação citotóxica em *A. cepa*, mas não no ensaio com cultura de células. Nos testes genotóxicos, sua ação foi percebida em *P. reticulata*, em *A. cepa* e na cultura de células de mamífero, mas apenas na sua concentração bruta. Essas alterações podem estar sendo causadas pela presença do cádmio, pois este pode apresentar uma atividade tóxica, mesmo em baixas quantidades (SOUZA, 2016).

Não é possível afirmar que o cádmio seja o único responsável pela atividade genotóxica, pois os efluentes são liberados no ambiente aquático como misturas complexas, que na maioria das vezes não se tem conhecimento da sua interação tóxica (HEWITT; MARVIN, 2005).

O ponto P3 que teve o pior IQA (32,9), que foi classificado como “ruim”, realmente apresentou resultados muito preocupantes. Em todos os ensaios de genotoxicidade, este foi o ponto que apresentou os maiores índices. Mas ele não apresentou nenhum resultado significativo, se tratando dos testes de citotoxicidade. Provavelmente essa alta taxa de genotoxicidade está sendo causada pela presença

dos metais pesados cádmio e chumbo, que ainda pode ser agravada pela baixa taxa de Oxigênio Dissolvido, pois esta pode interferir aumentando a toxicidade de substâncias já presentes na água (PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011).

Apesar de estar localizado logo após a Estação de Tratamento de água, o ponto P4 ainda apresentou limites acima da média de nitrogênio amoniacal, chumbo e DBO, sendo assim, exibiu um nível intermediário na análise de parâmetros físico químicos, e foi classificado como “regular”. Nos bioensaios apresentou efeito citotóxico em *A. cepa*, mas não na cultura de células. Sua genotoxicidade foi vista em *P. reticulata* e na cultura de células, nas concentrações 100% e 50%.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir dos ensaios ecotoxicológicos, realizados com *Poecilia reticulata*, *Allium cepa* e cultura de células C2C12, além das análises de parâmetros físico-químicos das amostras de água, nos permitem concluir que o ponto P1 não apresentou qualquer efeito tóxico. P2 exibiu um nível intermediário de efeitos citotóxico e genotóxico, provavelmente causados pela presença de cádmio. Já o ponto P3 foi avaliado com altos índices de genotoxicidade, possivelmente em decorrência da presença dos metais pesados (cádmio e chumbo). Por fim, P4 apresentou ações genotóxicas e citotóxicas com relativa significância.

É de extrema importância que exista uma preocupação com os efluentes (industriais e domésticos) que são depositados nesses pontos (P2, P3 e P4), pois são locais onde ocorrem as seguintes atividades: recreação, irrigação, pesca e consumo de água por animais. Devido ao fato das amostras de água apresentarem efeitos genotóxicos e citotóxicos, todos organismos envolvidos nessas atividades podem correr riscos.

5. REFERÊNCIAS

ANA. **Situação da água no mundo.** Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/agua-no-mundo>>.

Acesso em: 12 jul. 2018.

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.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of five carcinogenic- mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus Carpio* L. **Camp. Biochem. Physiol**, v. 85, n. 1, p. 5–9, 1986. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(86\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(86)90043-5)

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. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)

ANSAR AHMED, S.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)

APHA/AWWAWPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** p. 541, 1998.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. de; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. 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>

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)

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 3, p. 221–225, 2001. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2065>

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Water quality and pond soil for aquaculture**. International Center Experimental Station, 1992.

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

BURATTINI, S.; FERRI, R.; BATTISTELLI, M.; CURCI, R.; LUCHETTI, F.; FALCIERI, E. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. **European Journal of Histochemistry**, v. 48, n. 3, p. 223–233, 2004. <https://doi.org/10.4081/891>

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 211–214, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00070-6)

CAIRNS-JUNIOR, J. **Environmental monitoring for the preservation of global biodiversity: the role in sustainable use of the planet.** International Journal of Sustainable Development and World Ecology, v. 9, n. 2, p. 135–150, 2002.

CARDOZO, T. R.; ROSA, D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A. V.; DE OLIVEIRA, N. C. D. A.; DA SILVA PEREIRA, T.; PASTORIZA, T. F.; DA MOTTA MARQUES, D.; DE LEMOS, C. T.; TERRA, N. R.; VARGAS, V. M. F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 603, n. 1, p. 83–96, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.11.011>

CARRIJO, B. R.; BACCARO, C. A. D. Análise sobre a erosão hídrica na área urbana de Uberlândia (MG). **Caminhos De Geografia**, v. 1, n. 2, p. 70–83, 2000.

CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 569–574, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014>

CONAMA. **Resolução 357 de 2005.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 11 jun. 2017.

COSTA, A. F. S.; TEIXEIRA, C.; SILVA, C. S.; NASCIMENTO, J. Al. do; OLIVEIRA, M. M.; QUEIROZ, Y. D. O.; SILVA, M. D. J. Recursos Hídricos. **Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**, p. 67–73, 2012.

DIETZ, R.; RIGET, F.; CLEEMANN, M.; AARKROG, A.; JOHANSEN, P.; HANSEN, J. C. Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 245, n. 1–3, p. 221–231, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00447-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00447-7)

EVANS, J. P.; GASPARINI, C. The genetic basis of female multiple mating in a polyandrous livebearing fish. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 61–66, 2013. <https://doi.org/10.1002/ece3.435>

FELTRAN-FILHO, A. Morphometric considerations of the Uberabinha river basin – Minas Gerais. **Sociedade & Natureza**. v. 19, n. 1, p. 65–80, 2007.

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.; FARIA, M. H. A.; TOLEDO, M. C. B. de; CÉSAR, A. C. G. Biomonitoramento nas águas do rio Jaguari e Ribeirão Lavapés na região Bragantina. **The 4th International Congress on University-Industry Cooperation**, p. 1–8, 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>

FISKESJÖ, G. The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243–260, 1988. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90096-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90096-6)

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem Para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337–340, 2008.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 347–354, 2008. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.01>

FUNASA, F. N. de S. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em etas**. Fundação Nacional da Saúde, 2014.

GRABOWSKA, I.; SZELIGA, A.; MORACZEWSKI, J.; CZAPLICKA, I.; BRZÓSKA, E. Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. **Cell Biology International**, v. 35, n. 2, p. 125–133, 2011. <https://doi.org/10.1042/CBI20090335>

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 107–112, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00050-0)

GUIMARÃES, E. S.; LACAVAL, P. M.; MAGALHÃES, N. P. Avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia similis* na água captada no Rio Paraíba Do Sul e processada na Estação de Tratamento de Água do Município de Jacareí - Sp - Brasil. **Engenharia Sanitária E Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 124–130, 2004.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90035-3)

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>

HOUDE, A. E. **Sex, Color and Mate Choice in Guppies**. Princeton: Princeton University, 1997.

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, 87: Inorganic and Organic Lead Compounds**. Lyon: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2006.

IGAM. **Índice de Qualidade da Água**. Disponível em: <<http://portalinfohidro.igam.mg.gov.br/calculadora-de-iqa-e-ct>>. Acesso em: 15 jun. 2018a.

IGAM. **Calculadora IQA**. Disponível em: <<http://portalinfohidro.igam.mg.gov.br/calculadora-de-iqa-e-ct/calculadora-de-iqa>>. Acesso em: 15 jun. 2018b.

JACKSON, R. B. ; S. R. C. ; C. N. D. ; D. M. M. R. J. N. ; S. L. P. ; S. W. R. Water in a changing world. **Ecological Applications**, p. 1027–1045, 2001. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2001\)011\[1027:WIACW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2001)011[1027:WIACW]2.0.CO;2)

KUMAR, S.; SAHAY, S. S.; SINHA, M. K. Bioassay of distillery effluent on common guppy, *Lebistes reticulatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 2, p. 309–316, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00197446>

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>

LLORENTE, M. T.; PARRA, J. M.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S.; CASTAÑO, A. Cytotoxicity and genotoxicity of sewage treatment plant effluents in rainbow trout cells (RTG-2). **Water Research**, v. 46, n. 19, p. 6351–6358, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.039>

MAGALHÃES, D. de P.; FERRÃO-FILHO, A. da S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in

onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. 2006.

OECD. Guideline for the testing of chemicals 487 - In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2012.

OECD - ORGANIZAÇÃO DE COOPERAÇÃO E DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. Guideline for the testing of chemicals: Fish, acute toxicity test. 1992

OLIVEIRA, M. H. C. de. **Aproveitamento da água de chuva**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

OOST, D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

PARRON, L. M.; MUNIZ, D. H. de F.; PEREIRA, C. M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água**. 2011.

PEREIRA, B. B.; DE CAMPOS JUNIOR, 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>

REIFFERSCHIED, G.; ZIEMANN, C.; FIEBLINGER, D.; DILL, F.; GMINSKI, R.; GRUMMT, H. J.; HAFNER, C.; HOLLERT, H.; KUNZ, S.; RODRIGO, G.; STOPPER, H.; SELKE, D. Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test-Results of a round-robin study in the context of

standardisation according to ISO. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 649, n. 1–2, p. 15–27, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.07.015>

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

ROSOLEN, V.; HERPIN, U.; COELHO, L. M.; LUIS, J.; BRITO, S. Qualidade dos sedimentos no rio Uberabinha (Uberlândia , MG) e implicações ambientais. v. 39, n. 1, p. 151–159, 2009.

SALLA, M. R.; ARQUIOLA, J. P.; SOLERA, A.; ÁLVAREZ, J. A.; PEREIRA, C. E.; EDUARDO, J.; FILHO, A.; OLIVEIRA, A. L. De. Sistema de suporte à decisão em recursos hídricos na Bacia Hidrográfica do Rio Uberabinha , Minas Gerais. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 19, p. 189–204, 2014.
<https://doi.org/10.21168/rbrh.v19n1.p189-204>

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)

SILVA, F. R. **Uso e ocupação do solo associado à qualidade da água no Rio Uberabinha**. 2016.

SOUZA, M. J. B. Toxicidade dos Metais Pesados. **ResearchGate**, n. November, p. 13, 2016.

TOMAZ, B. C. A.; FERRI, R. N. da S.; BOSCHINI-FILHO, J. Frequency of micronucleation and others nuclear changes in cells of anemic patient's oral mucosa. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, p. 214–220, 2016.

TUCCI, C. E. M.; HESPANHOL, I.; NETTO, O. de M. C. **Gestão da Água no Brasil**. 2001.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Ž.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPEŠ, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 284–291, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1223-2>

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, 2005.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 28, n. 2, p. 227–236, 2005.