

## AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS: USANDO ANÁLISES MOLECULARES

### ASSESSMENT AND MONITORING OF WATER QUALITY: USING MOLECULAR ANALYSIS

**Loislene Oliveira Brito** - Doutora em Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Professora do Departamento de Ciências Biológicas – UEFS. ([loislene@gmail.com](mailto:loislene@gmail.com))

**Lafayette Dantas da Luz** - Doutor em Engenharia Ambiental – Cornell University. Professor do Departamento de Engenharia Ambiental – UFBA. ([lluz@ufba.br](mailto:lluz@ufba.br))

#### Resumo

Os ambientes aquáticos têm sofrido com o aporte continuado de compostos químicos que afetam as relações ecológicas de várias formas. Para se conhecer o quão é afetado o ecossistema, são necessários programas de monitoramento mais completos, contínuos e com a utilização de biomarcadores moleculares. Este trabalho objetiva auxiliar na escolha de bioindicadores para análises ambientais de corpos d'água, e estimular o uso de procedimentos moleculares (biomarcadores). Os testes moleculares são importantes para verificar o nível clastogênico de compostos químicos sobre o material genético dos indivíduos. Aqui são apresentados dois testes muito utilizados: o teste de Micronúcleo (MN), já estabelecido e adaptado aos organismos aquáticos, detecta pequenos núcleos, ao lado do principal, resultado de quebras dos cromossomos; e o teste de cometa, mais recentemente consolidado, é capaz de detectar fragmentações do DNA imperceptíveis ao teste de MN. Ambos os testes são rápidos e práticos de serem executados e de baixo custo, com ótimos resultados em espécies nativas. Com a retomada da necessidade de uma visão mais unificada dos processos ambientais, torna-se necessária a utilização de ferramentas que permitam uma visão holística do efeito dos compostos químicos no ambiente e, para isso, os testes moleculares são armas poderosas de monitoramento quando utilizados juntamente com as análises tradicionais.

**Palavras chave:** ambientes aquáticos, bioindicador, micronúcleos, testes moleculares, poluição.

#### Abstract

Aquatic environments have suffered from the continued input of chemicals affecting ecological relationships in several ways. In order to know the extent in which ecosystems are compromised, more complete and continued monitoring programs are necessary, including the use of molecular biomarkers. This work aims to assist in the choice of biomarkers for environmental analysis of water bodies, and considers two types of molecular procedures (biomarkers) widely used in recent years to verify the clastogenic level of chemicals on the genetic material of individuals. The micronucleus test (MN), already established and adapted to aquatic organisms, detects small nuclei close to the main nucleus as a result from chromosomes breakage. The comet test, most recently established, is able to detect the DNA fragmentation imperceptible to the MN. Both tests are quick and practical to be run and inexpensive as well, with great results in native species. With the resumption of the need for a more unified view of environmental processes, it is necessary to use tools that enable a holistic view of the effect of chemicals on the environment and, therefore, molecular tests are powerful weapons monitoring when used together with traditional analysis.

**Keywords:** aquatic environments, bioindicator, micronuclei, molecular tests, pollution.

## 1. INTRODUÇÃO

Continuada e crescentemente, a biota aquática tem sido exposta a um grande número de compostos de diferentes fontes, provenientes dos efluentes da indústria, dos processos de drenagem agrícola e de drenagem pluvial urbana, dos derrames acidentais de lixos químicos e dos esgotos domésticos. Essa ação antrópica sobre os ambientes aquáticos tem colocado em risco as espécies que os habitam, assim como as pessoas que se utilizam dessas águas para diferentes usos. A alimentação é um dos principais vetores de contaminação humana.

Quando lançadas no ambiente aquático, substâncias diversas são capazes de interagir com os organismos vivos, causando danos aos mesmos e se bioacumulando nos diferentes níveis tróficos, podendo gerar graves problemas ao ecossistema e às próximas gerações.

Análises ambientais devem ser abrangentes, eficientes e feitas de forma integrada, avaliando a qualidade da água juntamente com as respostas dos aspectos biológicos do sistema. Essas últimas podem ser identificadas via os chamados organismos sentinelas ou bioindicadores, animais ou plantas, que através da análise de sua saúde indicam a saúde do ambiente em que vivem.

Os bioindicadores têm sido usados em duas abordagens principais, segundo Arias e colaboradores (2007): em níveis superiores de organização, como comunidades, populações e ecossistemas; ou, em nível individual, analisando-se alterações comportamentais, malformações, mudanças em taxas de crescimento, reprodução, alimentação, ou alterações bioquímicas e fisiológicas. Nessas últimas, se enquadram as análises moleculares que tentam verificar o nível de dano que as substâncias xenobióticas causam ao DNA dos indivíduos monitorados, como o teste de Micronúcleos e o Cometa.

Este trabalho visa contribuir com os estudos de análise ambiental, comparando testes moleculares simples e baratos que podem dar uma visão ampla do nível de

contaminação, bem como auxiliar na escolha de bioindicadores para esses estudos.

## 2. POLUIÇÃO DOS CORPOS D'ÁGUA

O nível de contaminação das águas constitui fator limitante às condições e à qualidade de vida dos seres vivos que ocupam os ecossistemas aquáticos, seu entorno e, também, dos seres humanos que necessitam da água para diferentes usos.

As atividades humanas, seja nos centros urbanos e industriais ou no ambiente agrícola e agropecuário, geram uma série de resíduos como: agrotóxicos, esgotos urbanos, efluentes da indústria e algicidas. Essas substâncias contaminam as águas de forma direta, com o lançamento nos corpos aquáticos, ou indiretamente, por meio das chuvas ou infiltração no solo, o que pode também atingir o lençol freático (GRISOLIA, 2005). As substâncias lançadas na atmosfera facilmente atingem regiões distantes das fontes emissoras, e podem contaminar também corpos de água longínquos (ALMEIDA *et. al.*, 2007).

Visando à gestão da qualidade das águas, procedimentos e parâmetros indicadores foram sendo incorporados nos protocolos de análise e monitoramento. Estes, tradicionalmente, referem-se aos aspectos organolépticos (cor, cheiro e gosto) e patogênicos da água. Os indicadores físicos e químicos davam conta, além das condições organolépticas, das de salubridade/potabilidade, dentre elas, destacam-se: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio e fósforo totais, resíduos e turbidez. Parâmetros químicos, inorgânicos e orgânicos, também, compõem padrões de qualidade das águas, a exemplo do previsto na Resolução CONAMA 357/2005 (classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento) (CONAMA, 2005) e na Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 (potabilidade para consumo humano) (BRASIL, 2011). Os indicadores

microbiológicos, como a presença de bactérias do grupo coliforme, foram precursores em termos da detecção de contaminação biológica. Esses parâmetros nos dão a identificação e a quantificação dos poluentes nos corpos d'água, mas não seu efeito tóxico, o que deve ser feito através de análises biológicas.

Diante dos efeitos de poluição generalizada, inclusive por novas substâncias sintéticas, a legislação tem estendido enormemente as condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos d'água (CONAMA, 2005; 2011), à medida que se observam seus efeitos negativos sobre a saúde dos organismos. Adicionalmente, em função da possível ocorrência de poluentes ainda não identificados, fontes de poluição diversas, propriedades físico-químicas muito distintas e, ainda, dos potenciais efeitos sinérgicos que podem ocorrer entre os mesmos no ambiente, torna-se necessária a adoção de outros tipos de monitoramento, como: qualidade biológica da água (HELLAWELL, 1996), da integridade biótica das comunidades aquáticas (KARR, 1991), da saúde do ecossistema (KARR; DUDLEY, 1981; CALOW, 1992; POLLARD; HUXHAM, 1998; NORRIS; THOMS, 1999), ou da integridade ecológica (POLLARD; HUXHAM, 1998) ou ambiental (O'KEEFFE *et al.*, 2007), dentre outros. Estas abordagens visam identificar condições que exprimam uma síntese dos inúmeros fatores intervenientes na qualidade do ambiente e que, separadamente, pouco dizem sobre o todo. Tais abordagens têm feito uso de ensaios ecotoxicológicos, uso de bioindicadores e biomarcadores, os quais são respostas dos sistemas vivos a agentes estressores, mensurados em nível bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Em levantamentos feitos no Brasil, Almeida e colaboradores (2007), avaliaram a presença dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), muitos deles proibidos no país, e perceberam a escassez de programas de monitoramento contínuos, assim como programas que identifiquem as principais fontes dessas substâncias para o

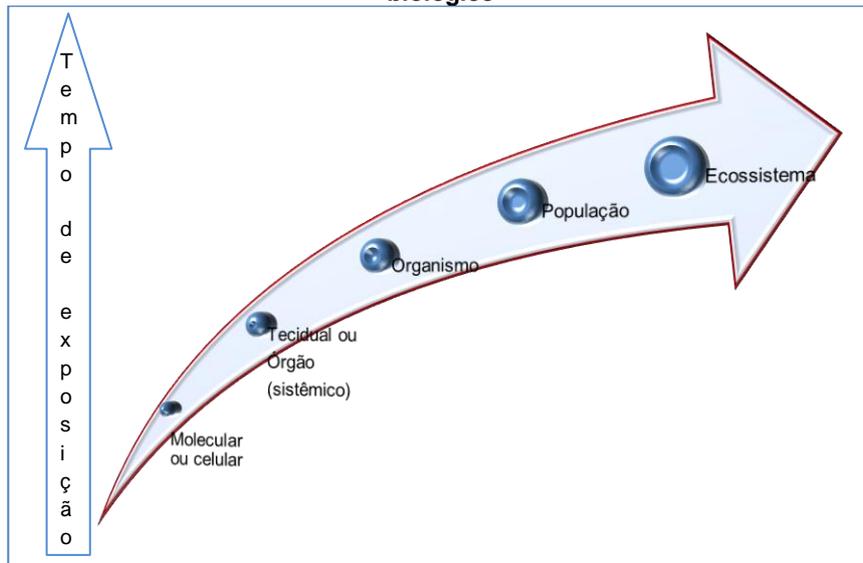
meio ambiente, já que estas são persistentes nos diferentes compartimentos ambientais (água, ar, solo) e são tóxicas para os seres vivos, pois têm alta hidrofobicidade, grande tendência para se acumular ou bioconcentrar nos tecidos dos organismos vivos. Nesse levantamento, os autores ressaltam, ainda, a falta de monitoramento na maior parte do Brasil, já que os trabalhos estão concentrados na região sudeste do país, bem como uma dificuldade de acesso aos dados por parte da sociedade civil.

O monitoramento ambiental deve ser contínuo e abrangente, não só com a realização de análise química direta da água e do sedimento, que não é capaz de demonstrar o nível de toxicidade dos componentes químicos sobre os organismos vivos, mas avaliando seu efeito conjunto diretamente sobre os organismos presentes nos corpos d'água, e buscando determinar o quanto isso pode afetar as futuras gerações, inclusive os seres humanos. É difícil estabelecer ligação entre os efeitos ecológicos da poluição e a saúde do ambiente e dos seres humanos (STAHL, 1991). Para isso, organismos sentinela (bioindicadores) podem demonstrar precocemente respostas ao estresse ambiental causado pela mistura de compostos químicos que são carregados até o ambiente aquático e, assim, detectarem uma grande variedade de alterações induzidas xenobioticamente no nível celular (biomarcadores). Como os organismos bioindicadores, dependendo do nível trófico, podem bioacumular as substâncias tóxicas, eles fornecem uma noção dos efeitos desses poluentes sobre um indivíduo, e sobre a magnitude do efeito na função de um órgão específico. Dessa forma, podemos prever os efeitos sobre a reprodução dos indivíduos e, conseqüentemente, sobre a sobrevivência da espécie. Já os agentes genotóxicos, que são capazes de produzir alterações no material genético dos indivíduos, afetam a biodiversidade através da transmissão dessas alterações às futuras gerações, reduzindo as populações e causando o desequilíbrio ecológico.

De acordo com Bolognesi e Hayashi (2011), a rotina de programas de biomonitorização de ambientes aquáticos necessita do estudo de biomarcadores em diferentes bioindicadores que apresentem estratégias ecológicas diferentes, a fim de avaliar o estresse induzido por poluentes

no ecossistema. Também, se faz necessário que a análise de dano seja feita em diferentes ordens dentro do sistema biológico, para se ter a ideia de quais níveis estão sendo atingidos à medida que o tempo de exposição aos poluentes se prolonga (Figura 1).

**Figura 1: Representação esquemática da ordem de resposta a poluentes dentro de um sistema biológico**



Fonte: Adaptado de Arias *et al.* (2007).

### 3. AGENTES GENOTÓXICOS

Mutações e anomalias cromossômicas podem ocorrer por causas naturais/genéticas, promovendo erros durante o metabolismo do DNA. No entanto, mudanças também são provocadas por agentes genotóxicos ou mutagênicos introduzidos artificialmente no ambiente aquático por ação antropogênica.

As células possuem mecanismos protetores que reparam os danos do material genético, mas existe um limite de dano capaz de ser corrigido e, caso as alterações não sejam efetuadas, podem causar mudanças que permanecerão e poderão ser transmitidas às próximas gerações, dependendo do tipo de célula atingida, ou mesmo gerar perda de material genético que pode causar morte da célula ou promover alterações no nível celular, no órgão ou no organismo inteiro, sendo capaz de atingir a população e a

comunidade do organismo (LEE; STEINERT, 2003).

Esses agentes genotóxicos são agentes físicos, químicos ou biológicos que afetam a integridade do DNA dos organismos vivos, promovendo alterações cromossômicas, como quebras no material genético (clastogênicos), mudanças no número de cromossomos (aneugênicos), mutações no DNA (mutagênico) ou terem um efeito citotóxico causando a morte de células. Ainda, podem ter um efeito mitogênico, ou seja, induzirem à divisão celular e à consequente proliferação das células descontroladamente. Dentre esses poluentes, estão os agrotóxicos, hormônios, detergentes, metais pesados, corantes, esgotos domésticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros compostos, derivados das atividades industriais, residenciais, agrícolas, de tratamento de água e esgoto (FONTANELE *et al.*, 2010). Além da ação individual, esses compostos são capazes de interagir

com o ambiente formando combinações inusitadas, podendo variar sazonalmente e nos diferentes nichos dos cursos d'água.

A quebra cromossômica gera fragmentos acêntricos (que não possuem centrômero e não podem se ligar ao fuso mitótico durante a divisão celular) que acabam não sendo incluídos na replicação ou no núcleo principal durante a divisão da célula, ficando separados como um ou vários núcleos secundários muito menores que o principal (micronúcleos). Esses micronúcleos podem ocorrer em diferentes momentos após o dano ao DNA, dependendo da cinética do ciclo celular e do mecanismo de indução (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011), e sinalizam a presença de contaminantes no ecossistema do indivíduo em estudo, e o nível de dano vai depender do tempo de exposição e do nível trófico. A fragmentação do DNA pode ser facilmente detectada através de técnicas simples e rápidas, utilizando-se as espécies bioindicadoras.

#### 4. ORGANISMOS DE AMBIENTES AQUÁTICOS UTILIZADOS COMO BIOINDICADORES

O uso de bioindicadores nos ambiente aquáticos é amplamente aplicado em análises ambientais. Diferentes espécies de peixes, ouriço-do-mar, mexilhões, ostras, caranguejos e vermes servem como bioindicadores das condições ambientais. Amostras para análise podem ser coletadas tanto diretamente no ambiente quanto em indivíduos transplantados para aquários em laboratórios (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Plantas também são utilizadas como indicadores de ambientes poluídos, através de experimentos *in loco* ou *in vitro*. Neste último caso, o sedimento ou a água contaminada são coletados no local de estudo e levados para cultivo das plantas em laboratório, sendo utilizadas espécies modelo de fácil manejo, como *Tradescantia sp* (GICHNER; VELEMÍNSKÝ, 1999), *Vicia faba* (SANG; LI, 2004), *Hordeum vulgare* (SANG *et al.*, 2006), *Triticum aestivum* (LI *et al.*, 2008) e *Allium cepa* (KLAUCK *et al.*, 2013). A avaliação conjunta de plantas e animais

também tem sido bastante utilizada, dando uma ideia mais completa do nível de contaminação do ambiente e de quais indivíduos do ecossistema estão sendo afetados.

Com relação ao uso de animais como indicadores da presença de compostos genotóxicos no ambiente, a grande maioria dos trabalhos utiliza bivalves e peixes. Os bivalves são os melhores indicadores para monitoramento da poluição de águas costeiras, devido à sua ampla distribuição geográfica, estilo de vida sésil, fácil amostragem, tolerância a uma gama variável de salinidade, alta acumulação de uma grande variedade de produtos químicos e de resistência ao estresse (GOLDBERG *et al.*, 1978). Além disso, mexilhões (*Mytilus sp*) podem ser criados facilmente em contentores posicionados a alguns metros sob a superfície do mar, o que facilita a coleta dos animais.

O teste de micronúcleos (MN), descrito no Item 5, foi aplicado com êxito em um grande número de estudos de campo que utiliza bivalves dos gêneros *Mytilus* (DOLCETTI; VENIER, 2002; VENIER; ZAMPIERON, 2005; BOCCHETTI *et al.*, 2008), *Mya* (DOPP *et al.*, 1996), *Perna* (SIU *et al.*, 2008), *Crassostrea* (BOLOGNESI *et al.*, 2006) e *Dressena* (SIU *et al.*, 2004; PAVLICA *et al.*, 2000; BINELLI *et al.*, 2010) como organismos indicadores para a avaliação dos compostos genotóxicos e de seus efeitos sobre ambientes marinhos e, também, de água doce. Esses estudos detectaram diferentes compostos capazes de gerar alterações cromossômicas. No Brasil, um exemplo do uso de mexilhões para análise das condições da água foi feito na bacia do Rio Guaíba, no Rio Grande do Sul. A espécie *Limnoperna fortunei* (mexilhão dourado) foi utilizada em testes laboratoriais, e usou-se água coletada de vários locais de descarga de esgotos ao longo do curso do rio e, também, de uma região de preservação ambiental. Esse estudo mostrou que os animais criados na água coletada de locais com efluentes urbanos apresentavam alto nível de danos ao material genético (VILLELA *et al.* 2007).

Em bivalves, o teste de MN é realizado com células da hemolinfa (hemócitos) ou com células retiradas das brânquias. Os hemócitos apresentam a vantagem de circular em um sistema vascular aberto, estão constantemente em contato com poluentes aquáticos e participam da eliminação de substâncias tóxicas, transporte e digestão de nutrientes e da reparação de lesões nos tecidos. São facilmente coletáveis, mas apresentam a desvantagem de serem subpopulações de células com diferentes suscetibilidades aos agentes xenobióticos. As células das brânquias, assim como a hemolinfa, também apresentam diferentes tipos celulares e têm a desvantagem de necessitar de uma preparação das células, o que impossibilita seu uso em monitoramentos de larga escala.

Os peixes apresentam vantagem como sentinelas porque respondem aos agentes xenobióticos de forma similar aos vertebrados e podem ser usados para avaliar a presença de substâncias que são prejudiciais aos seres humanos. Assim como os bivalves, podem ser tanto usados em testes de monitoramento em campo quanto em testes laboratoriais, criados em aquários. Dessa forma, uma infinidade de compostos pode ser testada quanto ao potencial teratogênico ou carcinogênico. Outra vantagem é que as espécies ocupam diferentes nichos do ambiente, tendo hábitos alimentares diversos, o que propicia uma avaliação mais completa do ambiente a ser monitorado. Também, são bioacumuladores de substâncias tóxicas e respondem a baixas concentrações dos mutagênicos. O inconveniente para utilização dos peixes é a necessidade de padronização, pois existem diferenças interespecíficas no metabolismo das substâncias xenobióticas às quais estão expostos, na capacidade de reparar danos no DNA e na capacidade de proliferação celular. Esses inconvenientes podem ser minimizados escolhendo-se indivíduos do mesmo sexo, idade, hábitos alimentares, saúde, *status* reprodutivo ou linhagem genética (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste de MN em peixes tem sido aplicado com sucesso, diferente de outros

métodos de estudo usando análise do DNA, pois os peixes possuem um número grande de cromossomos pequenos e difíceis de estudar. Dos peixes, foram testados diferentes tecidos, como células das brânquias, barbatanas, rins, células hepáticas e eritrócitos (células vermelhas do sangue) periféricos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; HAYASHI *et al.*, 1998; ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005; FERREIRA *et al.*, 2010). O epitélio branquial entra em contato direto com a água e apresenta grande sensibilidade aos poluentes ambientais, sendo que requer isolamento das células e protocolos complexos, além de ocorrer a morte dos peixes, o mesmo se aplica aos hepatócitos. As células das barbatanas estão em contato com o ambiente, mas requer indução de regeneração das mesmas para que possa ser analisada a formação ou não dos MN, ou a detecção de dano ao material genético.

As células mais utilizadas nos monitoramentos ambientais utilizando peixes como bioindicadores são os eritrócitos que, nesses indivíduos, são nucleados e permitem o estudo dos MN ou do cometa. Seu uso evita procedimentos complexos, são de fácil coleta no próprio ambiente de estudo e não há necessidade de sacrificar os animais. O primeiro estudo com MN de peixes foi feito com *Umbra pygmea* (HOOFTMAN; RAAT, 1982) e validado por vários outros trabalhos. CARRASCO *et al.* (1990) foram os primeiros a criarem os critérios específicos para o estudo dos MN em eritrócitos de peixes. Al-Sabiti e Metcalfe (1995) reuniram dados de uma série de trabalhos que utilizaram espécies de peixes teleosteos expostos a diferentes compostos poluentes em condições de campo e de laboratório. Esses trabalhos mostraram a sensibilidade dos peixes à presença das substâncias genotóxicas, com a produção de eritrócitos com MNs (Tabela 1). Os autores apresentam, também, um efeito de dosagem, ou seja, quanto maior a dosagem, maior o número de MNs encontrados. Hooftman e Raat (1982) revelaram que o surgimento dos MNs dependia, além da dose do agente

administrado, também do período de exposição.

**Tabela 1: Espécies de peixes teleósteos utilizados em teste com compostos indutores de MN em eritrócitos de peixes expostos em laboratório ou *in situ***

Espécies	Compostos	MN controle (% de MN espontâneos)	MN após exposição
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Aflatoxina B1	6.8±1.6	21.3±1.7
	Aroclor 1254 (PCBs) bifenilpoliclorados		76.3±3.3
	Benzamidina		27.3±2.1
	Benzo[a]pireno		36.5±1.3
	Metilcolantreno		42.8±3.1
<i>Cyprinus carpio</i>	Aflatoxina B1	6.2±1.6	19.6±2.1
	Aroclor 1254 (PCBs) bifenilpoliclorados		76.2±1.3
	Benzamidina		27.3±2.1
	Benzo[a]pireno		42.3±2.3
	Metilcolantreno		44.8±2.2
<i>Tinca tinca</i>	Aflatoxina B1	6.5±1.4	20.5±2.1
	Aroclor 1254 (PCBs) bifenilpoliclorados		36.8±3.5
	Benzamidina		33.3±2.6
	Benzo[a]pireno		34.3±4.3
	Metilcolantreno		36.8±3.9
<i>Carassius auratus gibelo</i>	Cromo IV	10.1±1.0	23.0±3.0
	Cromo III		34.0±2.0
	Mercúrio (Hg <sup>2+</sup> )	5.2	57.6
	Metilmercurio	5.2	80.7
	Mitomicina C	0	72.2
	Selênio (IV)	5.2	38.6
	Água do rio	13.0±1.0	27.0±2.0
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Água do rio (7 dias)	0.33±0.49	1.1
<i>Perca fluviatilis</i>	Mix de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs)	-	15.5±2.0
	Efluentes de fábrica de papel	-	15.5±2.0
<i>Umbra limi</i>	Etilmetanosulfanato (EMS)	0.14	2.0
<i>Umbra pygmaea</i>		0.0	1.6±1.2
<i>Ictalurus nebulosus</i>		0.14	1.71
<i>Heteropneustes fossilis</i>	Mitomicina C	0.18±0.06	1.13±0.07
	Efluentes de fábrica de papel	0.25±0.1	1.25±0.4
<i>Genyonemus lineatus</i>	Hidrocarbonetos clorados (DDT, PCB)	0.8±1.1	6.8±5.1
	Mix de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs)	-	6.8±5.1
<i>Paralabrax clathratus</i>	Hidrocarbonetos clorados (DDT, PCB)	0.8±1.1	6.8±5.1
	Mix de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs)	-	6.8±5.1
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Hidrocarbonetos clorados (DDT, PCB)	-	0.2-2.79

Fonte: adaptado de Al-Sabit e Metcalfe, 1995.

No Brasil, uma série de trabalhos de monitoramento ambiental tem utilizado espécies nativas. Em estudo realizado na zona estuarina de Tramandaí e Mampituba, no Rio Grande do Sul, foram analisados eritrócitos de Tainha (*Mugil sp.*) e de peixe-gato (*Netuma sp.*). Estes animais se alimentam de outros organismos e de detritos no sedimento, por isso são considerados bioacumuladores. O aumento de danos no DNA ocorre de forma sazonal, se agravando na primavera e no verão, correspondendo ao grande número de pessoas que passam a frequentar tais ambientes nesses períodos, e ampliando o aporte de compostos antropogênicos na água (ANDRADE *et al.*, 2004).

A espécie *Oreochromis niloticus* foi exposta em teste laboratorial à água do rio Cubatão do Sul, o qual abastece a cidade de Florianópolis e recebe efluentes domésticos e resíduos da agricultura. O contato dos animais com a água coletada em diferentes pontos do rio gerou uma alta frequência de danos ao DNA dos indivíduos, sugerindo que a água apresenta alto potencial genotóxico para os seres vivos, incluindo os humanos, já que, como mencionado, os peixes são ótimos bioindicadores para os vertebrados (FUZINATTO *et al.*, 2013).

Estudos no Pantanal, no rio Paraguai, próximo à cidade de Cáceres, utilizaram as espécies *Pimelodus maculatus* e *Leporinus friderici* que se mostraram bons indicadores *in situ* da qualidade dessas águas (PIMENTA *et al.*, 2013). *P. maculatus* também foi usado como bioindicador no estudo feito no Rio Paraíba do Sul, que atravessa regiões densamente habitadas dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e que recebe resíduos industriais e agrícolas sem tratamento. Os resultados mostraram alterações gerais no metabolismo dos indivíduos e, também, na integridade funcional dos órgãos, como brânquias e fígado. A presença de agentes genotóxicos também ficou evidenciada pelas alterações no DNA, com alta formação de MN. O péssimo estado de saúde dos peixes deixou clara a necessidade de cautela na utilização da

água dos reservatórios amostrados (BRITO *et al.*, 2012).

No Lago Paranoá, em Brasília, Grisolia *et al.*, (2009) usaram como bioindicadores *Steindachnerina inculpita* (onívoro/detritívoro), *Cichla temensis* (piscívoro) *Oreochromis niloticus* (onívoro/detritívoro) *Cyprinus carpio* (algívoro), *Hoplias malabaricus* (piscívoro), *Astyanax bimaculatus lacustres* (herbívoro), e *Geophagus brasiliensis* (onívoros). As espécies piscívoras mostraram maior nível de dano ao material genético que as herbívoras. No mesmo ambiente, foi encontrada uma variação muito grande dos danos causados pelos poluentes, dependendo do nível trófico ocupado pelo indivíduo, de sua capacidade de alternar entre hábitos alimentares e de mudanças no comportamento devido ao estresse ambiental. Em várias localidades do oeste da Amazônia, Melo *et al.* (2013), utilizando como objeto oito espécies da ordem Gymnotiformes da região, com indivíduos de diferentes hábitos, encontraram a mesma relação entre rotinas alimentares e a quantidade de danos ao DNA.

## 5. TÉCNICAS DE ANÁLISE DE DANOS AO MATERIAL GENÉTICO: MICRONÚCLEOS (MN) E COMETA

Há uma variedade de testes para detectar danos ao DNA das células, alguns mais trabalhosos e custosos, outros mais simples e mais baratos. Aqui, trataremos dos dois testes mais usados em análises ecotoxicológicas dos ambientes aquáticos: teste de MN e de cometa.

### 5.1 Teste de Micronúcleos (MN)

O material genético, localizado no núcleo das células eucarióticas pode sofrer danos causados por agentes químicos (genotóxicos ou aneugênicos) e físicos (radiação). Esses danos causam quebras nos cromossomos, gerando fragmentos que podem ser perdidos em divisões celulares futuras ou perturbam o funcionamento normal da divisão celular. Também, pode ocorrer a perda de cromossomos inteiros, gerando células

com número cromossômico desigual (aneuploidia). Esses fragmentos ou cromossomos inteiros que se perdem não são incluídos nos núcleos das células-filhas após a divisão da célula, permanecem no citoplasma, são envolvidas por membrana e podem dar origem a um ou mais "núcleos" secundários menores - os micronúcleos (HEDDLE, 1973). Fenech (2000) faz uma classificação dos tipos de estruturas micronucleares que podem ser formadas. A figura 2 mostra o tipo de MN mais comumente encontrado nas preparações de células.

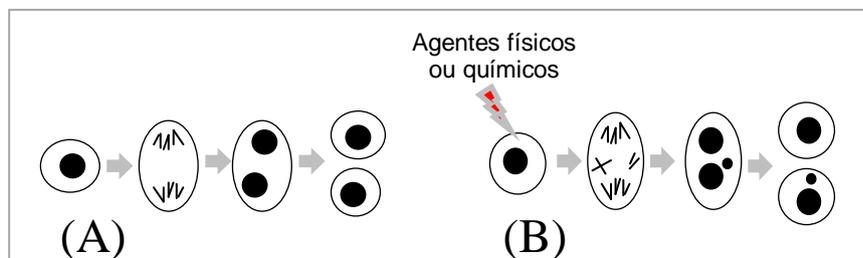
A frequência de MN numa espécie, num dado momento, reflete uma resposta complexa entre o/os agente(s) agressor(es) e o mecanismo fisiológico de defesa do organismo que está sendo agredido. Alguns indivíduos possuem uma maior capacidade de reparar os danos que outros (MERSCH *et al.*, 1996).

A citogenética clássica estuda os cromossomos, seu número, forma, tamanho em cada espécie, e é possível até mesmo determinar qual cromossomo foi

perdido completamente ou qual perdeu um fragmento. São técnicas complexas e mais detalhadas que necessitam de células em divisão (metáfase) e requerem mais tempo para ser desenvolvidas. No caso de monitoramento ambiental, em que se deseja verificar se os organismos do *habitat* estudado estão sofrendo algum tipo de agressão por parte de compostos xenobióticos, são necessários testes mais simples e rápidos, mas que sejam seguros. Nesse caso, foi desenvolvido o teste para a detecção dos micronúcleos já que estes refletem os danos estruturais causados pela ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos sobre o DNA (EVANS, 1997).

O teste de MN foi inicialmente desenvolvido em roedores, por Schmid (1975), e hoje é amplamente aplicado para análise do efeito dos poluentes presentes no ar e em ambientes aquáticos (DE FLORA *et al.*, 1993; AL-SABTI; METCALFE, 1995; BRINKMANN *et al.*, 2014), e em animais, plantas e seres humanos (ALVES *et al.*, 2011; 2014).

**Figura 2: Diagrama esquemático comparativo entre uma divisão celular normal e uma divisão desequilibrada originando os MN.**



(A) Divisão celular normal: cromossomos são separados igualmente entre as células-filhas. (B) Divisão celular anormal: fragmentos cromossômicos acêntricos ou que não estejam ligados ao fuso mitótico não são carregados e ficam separados do núcleo principal. Fonte: adaptada de Fenech (1997).

Para o estudo dos ambientes aquáticos, a análise de MN é feita em diversos organismos, como mostrado no item 4, de plantas, células humanas a peixes e outros organismos aquáticos, como ouriço do mar, mexilhões, ostras, caranguejos e vermes. A grande maioria dos estudos sobre o efeito genotóxico do ambiente aquático poluído utiliza como foco os bivalves e os peixes.

No caso de peixes, essa técnica se mostrou ideal, pois esses organismos apresentam grande número de cromossomos muito pequenos e difíceis de serem analisados por citogenética clássica. Também, são considerados organismos sentinelas ideais, pois podem indicar o potencial de exposição da população humana a agentes genotóxicos presentes na água, já que respondem como os vertebrados superiores aos agentes e,

também, por serem uma rota de transferência direta dos contaminantes aos humanos, via alimentação. O ensaio de micronúcleos (MN) é usado em qualquer população de células em proliferação e, por isso, tem sido amplamente aplicado em um grande número de espécies selvagens ou em criadouros, no campo ou em laboratório. Se forem utilizados os eritrócitos, que podem ser coletados e as lâminas confeccionadas no ambiente, não há necessidade de sacrificar o animal.

Apesar das muitas vantagens, o teste de MN não é capaz de detectar mudanças mais sutis no material genético do indivíduo, como mutações pontuais na sequência do DNA, ou fragmentos tão pequenos que seriam perdidos sem gerar os MNs.

### 5.2 Teste cometa

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1994), o teste do cometa ou teste de eletroforese de uma só célula (SCGE) é um teste simples, sensível, barato e rápido, com resultados em um dia. Para sua realização, são necessárias poucas células e, como no teste de MN, podem ser usadas células cultivadas ou coletadas diretamente de diferentes organismos, plantas, vertebrados e invertebrados. Essa técnica permite também analisar o nível de dano no DNA de diferentes células de um mesmo indivíduo, determinando quais

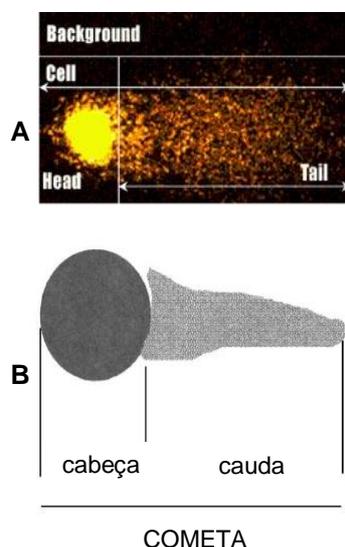
órgãos/tecidos são mais afetados pelo agente agressor (LEE; STEINERT, 2003).

O ensaio de micronúcleos exige que as células tenham passado por divisão celular para que se formem os MNs, enquanto no ensaio do cometa, podem ser usadas tanto células individuais que passaram por divisão (mitose ou meiose), quanto as que não se dividiram. O teste detecta quebras em fita simples de DNA, mesmo que tenha baixos níveis de danos (DEVENTER, 1996; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Quando o teste cometa começou a ser utilizado, surgiram problemas com a padronização na análise da imagem obtida. Atualmente, o problema foi resolvido com a utilização de programas que fazem a análise do comprimento da cauda e a porcentagem do DNA nela presente (LEE; STEINERT, 2003). No teste, o DNA fragmentado migra do núcleo através do gel e formará uma cauda. Quanto mais fragmentado estiver o DNA, maior será a cauda e maior quantidade de DNA ela terá, aumentando o brilho da fluorescência, como mostrado na figura 3 [Tail moment = (% DNA na cauda X tamanho da cauda) /100]. Se o DNA estiver íntegro, não há formação da cauda. Alguns programas de análises do teste encontram-se livres para download na página:

<http://www.cometassayindia.org/downloads.htm>.

**Figura 3: Diagrama mostrando um típico cometa com a distribuição do DNA na cabeça e na cauda**



**A:** Imagem de uma análise típica de um teste cometa feita com Komet™ software. (<http://www.cometassayindia.org/downloads.htm>).

**B:** Esquema do teste cometa mostrando a distribuição do DNA fragmentado e dispersado na cauda e na cabeça. Adaptado de Lee e Steinert (2003).

No início, os testes surgiram com a necessidade de estudo de danos em mamíferos, com linfócitos humanos danificados por agentes químicos e físicos (SINGH et al., 1988), mas logo foram adaptados para estudos genéticos ecotoxicológicos em todos os organismos (plantas, moluscos, vermes, peixes, anfíbios). Hoje, tanto o teste de MN quanto de cometa estão sendo usados em conjunto no monitoramento do ambiente aquático e com peixes como bioindicadores (FERRARO et al., 2004; BUCHINI et al., 2004; VILLELA et al., 2007); ou a combinação de dois bioindicadores, peixe e mexilhão (ANDRADE et al., 2004). Nas análises utilizando peixes, o teste de cometa se mostrou mais sensível na detecção dos danos ao DNA que o teste de MN.

## 6. ESCOLHA DO BIOINDICADOR

Na investigação da qualidade de ambientes aquáticos de forma mais completa, além das metodologias tradicionais de análise da água, se faz necessário o uso de bioindicadores, e a sua escolha deve levar em conta a estrutura laboratorial disponível para a realização dos testes, o tipo de biomarcadores que se quer empregar, as espécies habitantes no ambiente de estudo e o tipo de tecido a ser escolhido para as análises moleculares.

Como descrito anteriormente, quaisquer indivíduos podem ser utilizados para indicar as condições do ambiente a ser estudado, mesmo indivíduos que não habitem o local de estudo, como peixes teleósteos e mexilhões (criados em aquários com água do ambiente que se quer analisar) e/ou plantas modelo (cultivadas no sedimento ou na água do ambiente em estudo). Comparando estudos de campo com laboratoriais, tem se verificado uma maior sensibilidade na detecção de alterações em indivíduos coletados no campo do que naqueles criados em laboratório. Vários fatores estão relacionados a essa diferença, como maior variabilidade genética nas populações, variabilidade do ambiente aquático,

disponibilidade de alimento, efeitos sazonais, variações nos parâmetros físico-químicos da água e devido à presença de outros agentes agressores (BOLOGNESI et al., 2006; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

Quando se utilizam animais, deve-se levar em conta qual tecido será usado, pois alguns necessitam de técnicas mais elaboradas de coleta e de cultivo de células do que outros, havendo a necessidade do transporte dos animais do ambiente para o laboratório e o sacrifício dos mesmos.

A grande maioria dos trabalhos utiliza peixes, preferencialmente, a mexilhões, anfíbios e mamíferos. Isso ocorre pela facilidade da coleta de material, se forem usados os eritrócitos do sangue, obtidos diretamente no campo e sem a necessidade de sacrifício dos animais. Por outro lado, os moluscos, por serem sésseis, podem ser cultivados em criadouros, nos testes em ambiente marinho, não havendo necessidade da coleta aleatória dos indivíduos no ambiente, e os criadouros podem ser posicionados no local de interesse do estudo. Outro fator importante numa análise ambiental é a utilização de bioindicadores pertencentes a diferentes níveis tróficos, pois a bioacumulação dos contaminantes na cadeia trófica apresenta um quadro mais real do nível de contaminação e de sua abrangência, como no exemplo dos peixes, com os carnívoros acumulando mais compostos, por estarem no topo da cadeia, seguidos de onívoros, piscívoros, detritívoros e, por último, os herbívoros com menor bioacumulação. Outro ponto importante é que algumas espécies são mais sensíveis aos agentes agressores que outras. Muitos fatores podem estar envolvidos nessa sensibilidade, tais como, a capacidade fisiológica da espécie ou do indivíduo, sistema de reparo do DNA eficiente, mecanismos de defesa e o nível trófico a que pertence.

Se a escolha for pelas plantas, os pesquisadores têm utilizado espécies conhecidas e de fácil cultivo, com análises executadas em laboratório com cultivo em água ou sedimento coletado no ambiente contaminado. Nesse caso, pode-se usar

tanto o teste de MN quanto do cometa. No caso de plantas coletadas diretamente no ambiente, o teste mais indicado seria o cometa, por não necessitar de células que estejam em processo de divisão. O uso conjunto de dois ou mais bioindicadores, como peixes e mexilhões ou peixes e plantas, tem sido bastante utilizado.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A heterogeneidade dos ecossistemas aquáticos e o grande aporte de substâncias que chegam até eles dificultam o estudo do impacto ambiental de forma completa. O uso de bioindicadores que pertençam a diferentes níveis tróficos, que habitem microambientes diversos nos corpos d'água, que apresentem variação nos níveis de sensibilidade aos poluentes e, ainda, cujas análises atinjam níveis de complexidade distintos (de comunidade, individual, celular e molecular) permite uma visão mais eficiente nos estudos de monitoramento ambiental. Todos os parâmetros aqui discutidos são necessários para uma visão mais completa e mais próxima da realidade. Para um ambiente complexo, precisamos aprender a pensar de forma holística, já que os efeitos da poluição do ambiente aquático não se restringem a ele, podendo atingir as populações que dependem da água para outros usos, incluindo os seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135, 1995.
- ALMEIDA, F.V.; CENTENO, A.J.; BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. Substâncias tóxicas persistentes (stp) no Brasil. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p.1976-1985, 2007.
- ALVES, N.O.; LOUREIRO, A.L.M.; DOS SANTOS, F.C.; NASCIMENTO, K.H.; DALLACORT, R.; CASTRO VASCONCELOS, P.C.; HACON, S. S.; ARTAXO NETTO, P.E.; MEDEIROS, S.R.B. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 1427-1433, 2011.
- \_\_\_\_\_; HACON, S.S., GALVÃO, M.F.O.; PEIXOTO, M. S.; ARTAXO, P.; VASCONCELLOS, P.C.; MEDEIROS, S.R.B. Genetic damage of organic matter in the Brazilian Amazon: a comparative study between intense and moderate biomass burning. *Environmental Research*, v. 130, p. 51-58, 2014.
- ANDRADE, V.M.; SILVA, J.; SILVA, F.R.; HEUSER, V.D.; DIAS, J.F.; YONEAMA, M.L.; FREITAS, T.R.O. Fish as bioindicators to assess the effects os pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 44, p. 456-468, 2004.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; 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 e Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.
- ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.62, p.42-52, 2005.
- BINELLI, A.; COGNI, D.; PAROLINI, M.; PROVINI, A. Multibiomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, v. 79, p. 518-528, 2010.
- BOCCHETTI, R.; FATTORINI, D.; PISANELLI, B.; MACCHIA, S.; OLIVIERO, L.; PILATO, F.; PELLEGRINI, D.; REGOLI, F. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, v. 89, p. 257-266, 2008.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n.1, p. 205-213, 2011.
- \_\_\_\_\_; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; SCIUTTO, A. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of spill: Haven case study. *Marine Environmental Research*, v. 65, p. 287-291, 2006.

- BRINKMANN, M.; BLENKLE, H.; SALOWSKY, H.; BLUHM, K.; SCHIWY, S.; TIEHM, A.; HOLLERT, H. Genotoxicity of heterocyclic PAHs in the micronucleus assay with the fish liver cell line RTL-W1. *PLoS One*, v. 9, n.1, p.1-8, Jan. 2014.
- BRITO, I.A.; FREIRE, C.A.; YAMAMOTO, F.Y.; ASSIS, H.C.S.; SOUZA-BASTOS, L.R.; CESTARI, M.M.; GHISI, N.C.; PRODOCIMO, V.; NETO, F.F.; RIBEIRO, C.A.O. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *Journal Environmental Monitoring*, v. 14, p. 615-625, 2012.
- BUCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DORR, A.J.M.; RIZZONI, M. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research*, v. 557, p. 119-129, 2004.
- CALOW, P. Can ecosystems be healthy? Critical considerations of concepts. *Journal of Ecosystem Health*, v.1, p.1-5, 1992.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 47, p. 2123-2136, 1990.
- CONAMA – CONSELHO NACIONAL EM MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 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. São Paulo, 24 p., 2005.
- \_\_\_\_\_. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. São Paulo, 9p. 2011.
- DE FLORA, S.; VIGANO, L.; D'AGOSTINI, F.; CAMORIANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*, v. 319, p. 167-177, 1993.
- DEVENTER, K. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 56, p. 911-918, 1996.
- DOLCETTI, L.; VENIER, P. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. *Marine Environmental Research*, v. 54, p. 487-491, 2002.
- DOPP, E.; BARKER, C. M.; SCHIFFMANN, D.; REINISCH, C. L. Detection of micronuclei of *Mya arenaria*: association with leukaemia and induction with an alkylating agent. *Aquatic Toxicology*, v. 34, p.31-45, 1996.
- EVANS, H.J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutation Research*, v. 392, p. 5-10, 1997.
- FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*, v. 392, p. 11-18, 1997.
- \_\_\_\_\_. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, C.O.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberrations tests. *Mutation Research*, v. 27, p. 103-107, 2004.
- FERREIRA, G.R.A.M.; LUZ, L.D.; NASCIMENTO, I.A.; REBELO, M.F. Avaliação ecotoxicológica em corpos d'água: um estudo de caso do açude do Polo Petroquímico de Camaçari, Bahia. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 15, n. 3, p. 33-44, jul./set. 2010.
- FONTANELE, E.G.P.; MARTINS, M.R.A.; QUIDUTE, A.R.P.; MONTENEGRO, R.M.M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica*, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.
- FUZINATTO, C.F.; FLOHR, L.; MELEGARI, S.P.; MATIAS, W.G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 98, p.103-109, 2013.

GICHNER, T.; VELEMÍNSKÝ, J. Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the Tradescantia stamen hair and micronucleus (MNC) assays. Mutation Research, v. 426, p.163-166, 1999.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos – mutações, câncer e reprodução .Brasília: Editora UnB, 2005. p. 392.

\_\_\_\_\_.; RIVERO, C.L.G.; STARLING, F.L.R.M.; SILVA, I.C.R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J.G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. Genetics and Molecular Biology, v. 32, n. 1, p. 138-143, 2009.

GOLDBERG, E.D.; BOWEN, V.T.; FARRINGTON, J.W. *et al.* The mussel watch. Environmental Conservation, v. 5, p. 101-125, 1978.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA K.; KINAE N.; SAOTOME K.; TANAKA N.; TAKAI A.; SASAKI Y. F.; ASANO N.; SOFUNI T.; OJIMA Y. . Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutation Research, v. 399, p.125-133, 1998.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage. Mutation Research, v. 18, p. 187-192, 1973.

HELLAWELL, J.M. The contribution of biological and chemical techniques to the assessment of water quality. In: BOON, P.J.; HOWELL D.L. (Ed.) Freshwater quality: defining the indefinable? Edinburgh: Scottish Natural Heritage, The Stationery Office, 1996. p. 89-101.

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

KARR, J.R. Biological integrity: a long-neglected aspect of water resources management. Ecological Applications, v.1, p. 66-84, 1991.

KARR, J.R.; DUDLEY, D.R. Ecological perspectives on water quality goals.

Environmental Management, v. 5, p. 55-68, 1981.

KLAUCK, C.R.; RODRIGUES, M.A.S.; SILVA, B.S. Toxicological evaluation of landfill leachate using plant (*Allium cepa*) and fish (*Leporinus obtusidens*) bioassays. Waste Management e Research, v. 31, n. 11, p. 1148-1153, 2013.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research/Reviews in mutation Research, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LI, G.; YUN, Y.; LI, H.; SANG, N. Effect of landfill leachate on cell cycle, micronucleus, and sister chromatid exchange in *Triticum aestivum*. Journal of Hazardous Materials, v. 155, p. 10-16, 2008.

MELO, K.M.; ALVES, I.R.; PIECZARKA, J.C.; DAVID, J.A. O.; NAGAMACHI, C.Y.; GRISOLIA, C.K. Profile of micronucleus frequencies and nuclear abnormalities in different species of electric fishes (Gymnotiformes) from the Eastern Amazon. Genetics and Molecular Biology, v. 36, n. 3, p. 425-429, 2013.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M-N; NAGEL, P. Induction of micronucleus in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutation Research, v. 371, p. 47-55, 1996.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis, v. 399, n. 2, p.135-147, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Nº 2914 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, 14/12/2011. Brasília, 2011.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações. São Carlos, SP: Editora RIMA, 2006. Cap. 17. p.421-432.

NORRIS, R.H.; THOMS, M.C. River Health. Freshwater Biology, Oxford, v. 41, p.194-479, 1999.

O'KEEFFE, J.; LENS, P.; van STEVENINCK, E. R.; DOUVEN, W.; van DAM, A.; van der STEEN, P. The environmental integrity of freshwater resources. In: ALAERTS; DICKINSON (Ed.). Water for a changing world – Developing local knowledge and capacity. London: Taylor & Francis Group, 2007. p.57-70.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research communications, v. 123, n.1, p. 291-298, 1994.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G. I. V.; VETMA, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of micronuclei in hemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. Mutation Research, v. 465, p.145-150, 2000.

PIMENTA, V.M.S.D.; SILVA, J.M.; NEPOMUCENO, J.C.; PAVANIN, L.A. In situ assessment of the Paraguay river water, in Brazilian pantanal, by means of micronucleus assay with fish and chemical analysis. Bulletin of Environmental contamination and Toxicology, v. 90, p. 427-433, 2013.

POLLARD, P.; HUXHAM, M. The European Water Framework Directive: a new era in the management of aquatic ecosystem health? Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystems, v. 8, p. 773-792, 1998.

SANG, N.; LI, G. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. Mutation Research, v. 560, p.159-165, 2004.

SANG, N.; LI, G.; XIN, X. Municipal landfill leachate induces cytogenetic damage in root tips of *Hordeum vulgare*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 63, p. 469-473, 2006.

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

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.

SIU, S. Y.; LAM, P. K.; MARTIN, M.; CALDWELL, C. W.; RICHARDSON, B. J. The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): a validation study in Hong Kong coastal waters. Marine Pollution Bulletin, v. 57, p. 479-492, 2008.

SIU, W. H. L.; CAO, J.; JACK, R. W.; WU, R. S. S.; RICHARDSON, B. J.; XU, L.; LAM, P. K. S. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquatic Toxicology, v. 66, p. 381-392, 2004.

STAHL, R.G. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. Ecotoxicol Environmental Safety, n. 22, p. 94-125, 1991.

VENIER, P.; ZAMPIERON, C. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. Environment International, v. 31, p.1053-1064, 2005.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M.; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A. P.; SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. Mutation Research, v. 628, p. 76-86, 2007.

Comet Assay Forum. Disponível em: <<http://www.cometassayindia.org/index.htm>>, Acessado em: 02 de junho de 2015.