



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA

JÉFFERSON FRÖHLICH

**RESPOSTAS CITOTÓXICAS DO ZEBRAFISH FRENTE A TRATAMENTO COM
ÁGUA DOCE ANTROPIZADA.**

CERRO LARGO

2019

JÉFFERSON FRÖHLICH

**RESPOSTAS CITOTÓXICAS DO ZEBRAFISH FRENTE A TRATAMENTO COM
ÁGUA DOCE ANTROPIZADA.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas – licenciatura da
Universidade Federal da Fronteira Sul como
requisito para obtenção do título de Licenciado em
Ciências Biológicas.**

Orientadora Prof^ª. Dra. Suzumeire Baroni

CERRO LARGO

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Fröhlich, Jéfferson
RESPOSTAS CITOTÓXICAS DO ZEBRAFISH FRENTE A
TRATAMENTO COM ÁGUA DOCE ANTROPIZADA. / Jéfferson
Fröhlich. -- 2019.
31 f.:il.

Orientadora: Doutora Suzymeire Baroni.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Ciências Biológicas-Licenciatura , Cerro Largo, RS ,
2019.

1. Danio rerio. 2. Micronúcleo. 3. Anormalidades
nucleares. 4. Respostas citológicas. I. Baroni,
Suzymeire, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- LICENCIATURA
Rua Jacob Reinaldo Hauptthal, 1580, São Pedro, Cerro Largo-RS, CEP 97900-000, 55 3359-3981
cienciasbiologicas.ci@uffrs.edu.br, www.uffrs.edu.br

JÉFFERSON FROHLICH

RESPOSTAS CITOTÓXICAS DO ZEBRAFISH FRENTE A TRATAMENTO COM ÁGUA
DOCE ANTROPORIZADA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul.


Orientador: Prof.ª Dra. Suzymeire Baroni

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

25 / 11 / 2019

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dra. Suzymeire Baroni - UFFS


Prof. Dr. David Augusto Reynalte Tataje - UFFS


Dra. Roberta Daniele Klein - UFFS

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar a minha família que sempre me apoiou e me ajudou em todos os aspectos possíveis para que eu pudesse concluir esse meu objetivo. Agradecimento especial para minha mãe que “puxou minha orelha” lá em 2016 para que eu me inscrevesse nas vagas remanescentes do curso de Ciências Biológicas que ela ouviu no rádio enquanto eu trabalhava em uma fábrica de ração animal. Não tinha conseguido passar no curso que eu almejava e estava desanimado a continuar os estudos. Sabendo da vida difícil que leva um agricultor que não possui muitos hectares de terra, meus pais sempre me incentivaram muito a estudar e não ter o mesmo futuro que eles. Muito obrigado!

Também quero agradecer a minha madrinha Ilse Dresel e seu esposo Roque Dresel que me cederam um quarto em sua moradia durante 2 anos, pois como tinha algumas cadeiras na parte da noite não conseguia ir para casa por não ter horário de ônibus disponível nesses períodos. Durante esse tempo acabaram se tornando mais que meus dindos, levo vocês no meu coração como parte especial da minha família. Muito Obrigado!

Quero deixar meu agradecimento a Dona Darci e a Elisa por também me ceder um espaço em sua casa durante o período de 1 ano. Nesse tempo aprendi muitas coisas da área de direito, formação secundária da dona Darci, e também dei muitas risadas de suas histórias como professora e diretora aposentada da Escola Eugênio Frantz, formação principal dela. Muito Obrigado!

Não posso deixar de agradecer ao Rodrigo, técnico de Biologia da UFFS, por sempre estar disposto a ajudar e ensinar um novato na área da pesquisa em seus primeiros passos no laboratório. Obrigado pelos incontáveis conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração nas coletas (“capilares tão prontos? Vou cortar hein”; “novato em coleta paga o almoço”; “cadê a salada nesse prato?”). Agradecer também ao Manoel, meu colega de laboratório e de pesquisa, por ter me acolhido tão bem e me auxiliado em muitos aspectos durante esse período. Entrei de cabeça vazia nesse laboratório e toda parte técnica laboratorial que sei hoje é graças a esses dois. Obrigado!

Quero deixar registrado um agradecimento especial para minha orientadora Professora Dra: Suzymeire Baroni. És uma pessoa divertida, que alegra todos ao seu redor e, principalmente, está sempre disposta a ajudar quem precise. Agradeço pelos momentos de orientação, pelos conhecimentos compartilhados comigo, pelo apoio e oportunidade de realizar essa pesquisa. Muito Obrigado!

Agradeço aos membros da minha banca por aceitar meu convite, Dra: Roberta Daniele Klein que mesmo tendo um raso convívio durante esse período, pude perceber a profissional qualificada e dedicada que és. E professor Dr: David R. Tataje, um dos professores mais simpático e alto astral que tive a honra de ser aluno, sempre muito atencioso e disposto a ajudar quem necessitasse. Sem dúvida as melhores saídas de campo foram nas cadeiras ministradas pelo senhor. Fica aqui meu agradecimento, muito obrigado!

E por fim, mas não menos importante, agradecer aos meus verdadeiros amigos que estiveram comigo desde 2016 em todos os momentos bons e ruins desta caminhada: Robson, Manoela, Gêifer, Caroline, Daniele e Carlos. Agradeço pela amizade verdadeira e pelo companheirismo que construímos ao longo desses anos. Obrigado!

RESUMO

Diversos são os motivos que podem levar a alteração da qualidade da água em um determinado ambiente aquático, os quais acarretam em inúmeras consequências para os organismos que a habitam. Os corpos de água localizados na região noroeste do Rio Grande do Sul recebem periodicamente cargas de substâncias que podem conter propriedades genotóxicas, citotóxicas e mutagênicas que afetam a integridade genética desses organismos. Este trabalho teve como objetivo analisar as respostas citológicas do *Danio rerio* quando exposto a tratamento com a água doce antropizada do Rio Ijuí, RS, Brasil. Para tanto foi usado o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em 3.000 eritrócitos por indivíduo. Os resultados do teste de micronúcleo (MN) não foram estatisticamente significativos, sugerindo que os contaminantes presentes no rio não possuem potencial genotóxico para o aparecimento de MN, mas sim potencial clastogênico que induz anormalidades nucleares (AN).

Palavras-chave: *Danio rerio*. Micronúcleo. Anormalidades Nucleares. Respostas citológicas.

ABSTRACT

Several factors can lead to alterations of the water quality in aquatic environments, which has numerous consequences for the organisms that inhabit it. The water bodies located in the northwest region of Rio Grande do Sul periodically receive loads of substances that may contain genotoxic, cytotoxic and mutagenic properties, which affect the genetic integrity of living organisms. This research aimed to analyze the cytological responses of *Danio rerio* when exposed to treatment with anthropized fresh water from the Ijuí River, RS, Brazil. The micronucleus and nuclear abnormalities test in 3,000 erythrocytes per individual was used. The results of the micronuclei test (MN) were not statistically significant, suggesting that river contamination has no genotoxic potential for the emergence of MN, but clastogenic potential that induces nuclear abnormalities (NA).

Keywords: *Danio rerio*. Micronuclei. Nuclear abnormalities, Cytological responses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização dos pontos de coleta.....	19
Figura 2. Imagens das anormalidades encontradas em eritrócitos sanguíneos de <i>Danio rerio</i> submetidos às águas de quatro pontos do rio Ijuí.....	21
Figura 3. Valores totais de micronúcleo dos zebrafish do controle e dos testes submetidos ao teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.....	21
Figura 4. Valores totais de anormalidades dos zebrafish do controle e dos testes submetidos ao teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.....	22
Figura 5. Ponto 1 localizado no município de Santo Ângelo.....	31
Figura 6. Ponto 2 localizado no município de Cerro Largo.....	32
Figura 7. Ponto 3 localizado no município de Cerro Largo.....	33
Figura 8. Ponto 4 localizado no município de Roque Gonzales.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água dos aquários no momento da eutanásia dos zebrafish.....	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AN – Anormalidades nucleares

MN – Micronúcleo

SUMÁRIO

1.	REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1	Poluentes aquáticos	12
1.2	<i>Danio rerio</i>	13
1.3	Teste de micronúcleo (MN)	13
2.	DESENVOLVIMENTO	16
2.1	Artigo Científico	16
2.2	INTRODUÇÃO	17
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	18
2.3.1	Manutenção dos Peixes	18
2.3.2	Área de Amostragem	18
2.3.3	Confecção dos esfregaços sanguíneos	19
2.3.4	Coloração dos esfregaços sanguíneos	19
2.3.5	Contagem dos eritrócitos e análise das observações	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4	CONCLUSÕES	22
5	REFERÊNCIAS	23
3.	REFERÊNCIAS	25
4.	ANEXOS	27
5.	APÊNDICES	31

1. REFERENCIAL TEÓRICO

O censo demográfico realizado pelo IBGE em 2010, aponta que o Brasil teve um acréscimo populacional aproximado de 20 vezes em relação ao ano de 1872 (IBGE, 2011). Neste ano, a população era de aproximadamente nove milhões de habitantes, já no último censo realizado os números beiram os 190 milhões.

Esse crescente de população teve como fator importante a queda da taxa de mortalidade, após a década de 1940, bem como o aumento do índice de fecundidade. Dados que acarretaram numa porcentagem de crescimento da população brasileira muito alta, cerca de 3% na década de 50 (IBGE, 2011).

À medida que a população crescia, aumentava a demanda por alimentos e a produção agropecuária brasileira teve uma alta taxa de expansão. Desde a década de 70 a produção de grãos, por exemplo, obteve um acréscimo gigantesco. No ano de 1975, a colheita de grãos beirou os 45 milhões de toneladas, já no ano de 2013 a produção quadruplicou, alcançando a marca de 187 milhões de toneladas colhidas (ROMEIRO *et al.* 2014).

Esse alto sucesso no índice de produção foi obtido através de diversos métodos sendo um deles, sem dúvida o mais debatido na atual década, o uso abusivo de agrotóxicos. De acordo com o ministério da agricultura, pecuária e abastecimento agrotóxicos são definidos como substâncias físicas, químicas ou biológicas que visam alterar a composição da fauna e da flora, com o objetivo de “defesa” contra organismos considerados nocivos para o bom desenvolvimento da planta (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002).

Um dos destinos desse agrotóxico, principalmente em períodos de chuvas, são os córregos e rios localizados próximos a grandes terrenos onde é realizado o plantio e colheita de grãos. De acordo com Spadotto *et al.*, (2004) a lixiviação dos agrotóxicos tende a acarretar a contaminação das águas subterrâneas, e, nesse caso, as substâncias químicas são carreadas em solução juntamente com a água chegando aos aquíferos.

Para tanto, os recursos hídricos caracterizam-se por ser o destino final de alguns agrotóxicos levando à contaminação desses mananciais. Segundo Primel *et al.*, (2005) nas lavouras de arroz irrigado, o período de extravasamento da água coincide com a época de reprodução de algumas espécies de peixes e, portanto, parte dos defensivos usados nessa cultura que entram em contato com esses organismos possuem potencial prejudicial.

Para avaliar o efeito desses xenobióticos sobre o genoma de espécies eucariotas uma das ferramentas mais utilizadas é o teste de micronúcleos em organismos sensíveis, como exemplo, os peixes. Esses organismos são comumente utilizados nesta análise pois costumam

responder à contaminação de uma maneira semelhante aos mamíferos, porém com reações rápidas, mesmo em baixas concentrações das substâncias tóxicas.

Neste trabalho, foi usado o *Danio rerio* como organismo para os testes. Conhecido popularmente por *zebrafish*, paulistinha ou peixe zebra, é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), cipriniforme, da família dos ciprinídeos, tropical de água doce, que nos últimos anos vem atraindo a atenção da comunidade científica por apresentar algumas características próprias.

Perante o atual cenário brasileiro, onde as leis que visam proteger os ambientes aquáticos não são seguidas e executadas como deveriam, torna-se de suma importância o estudo dos impactos que a antropização acarreta em seres vivos.

1.1 Poluentes aquáticos

A água é um recurso natural abundante no Planeta, com cerca de 1.265.000 trilhões de m³, contudo, a água potável disponível para o consumo humano representa uma pequena porcentagem. 97% desse montante é de água salgada (mares e oceanos), 2% está concentrado nas calotas polares e aproximadamente 1% está presente nos continentes, distribuído em águas subterrâneas, lagos, rios e córregos, podendo ser utilizado para consumo humano (LINS, *et al.* 2010). A água possui importância fundamental para a existência de vida na terra, pois constitui elemento imprescindível para o desenvolvimento de todas as formas de vida do Planeta e, além disso, constitui um precioso insumo para diversas atividades econômicas e para a saúde da sociedade humana, tornando-se assim indispensável e insubstituível.

O crescimento populacional e as atividades humanas têm se despontado como os maiores responsáveis pela poluição do meio aquático. Os rios se tornaram ao longo dos anos depositários de rejeitos e resíduos de diversas formas, como por exemplo os esgotos domésticos e as águas residuárias provenientes de atividades pecuárias que contribuem com elevadas cargas orgânicas; as indústrias com uma série de compostos sintéticos e elementos químicos potencialmente tóxicos; e as atividades agrícolas com a contaminação por pesticidas e fertilizantes ricos em sais minerais (NETO & FERREIRA, 2007).

O despejo de esgotos juntamente com o excesso de fertilizantes acabam por chegar nos córregos e lagos por meio da chuva, o que resulta no acúmulo de alguns nutrientes essenciais, tais como Fósforo (P) e Nitrogênio (N), que contribuem para a proliferação descontrolada de fitoplâncton no ambiente aquático em questão causando eutrofização (MACEDO; SIPAÚBA-TAVARES, 2010)

Tundisi (2003) explica que no Brasil, e na maioria dos países em desenvolvimento, a maior parte do esgoto bruto é lançada sem nenhum tratamento prévio nos cursos de água. Esse

grande aporte de matéria orgânica e poluentes tem sido relatado como o principal responsável pela eutrofização de uma grande variedade de ambientes aquáticos, gerando preocupação crescente pelo alto grau de poluição e contaminação em que se encontram, atualmente, lagos e outros ambientes continentais.

De acordo com a SEMA, o Rio Ijuí, localiza-se na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas 28°00' a 29°05' de latitude Sul e 53°11' a 55°21' de longitude Oeste surge através da união dos rios Palmeira, Caxambu e Fiúza, próximo ao município de Panambi – RS. É o principal rio da bacia que leva o seu nome, possui área de 10.703,78 km² onde inserem-se 36 municípios, onde existe diversas atividades econômicas, sendo principalmente dominado pela presença de indústrias, além de extensas áreas agrícolas com intensa produtividade de grãos. A bacia está constituída por mais 12 rios que cortam cidades e áreas agrícolas, até desaguar diretamente no Rio Ijuí.

1.2 *Danio rerio*

O peixe *Danio rerio* (HAMILTON, 1822) é um dos mais importantes organismos modelo vertebrados em genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia e biomedicina (VASCOTTO, BECKHAM & KELLY, 1997; GRUNWALD & EISEN, 2002; RUBINSTEIN, 2003; AMSTERDAM & HOPKINS, 2006). Ele é um teleósteo de 3 a 4 cm da família Cyprinidae, tropical de água doce, domesticados vivem em média 2 a 3 anos, com indivíduos mais velhos sobrevivendo até 5,5 anos. São provenientes da Ásia, principalmente da região do Himalaia, onde pode ser encontrado em córregos e rios de águas calmas bem como nas plantações alagadas de arroz (ZORZETTO, 2013).

Sua importância se deve ao fato de serem de pequeno porte, fácil manutenção, custo baixo, com alta taxa reprodutiva, genoma sequenciado e ter 70% de homologia com mamíferos (KARI; RODECK; DICKER, 2007; LIESCHKE, CURRIE, 2007), dessa forma constituindo modelo importante para estudos comportamentais, genéticos e toxicológicos.

As vantagens deste modelo, combinadas com a ferramentas para sua manipulação e análise tornaram o zebrafish adequado para estudar diversificadas rotas na regulação gênica de eucariotos de maneira mais conveniente e barata que qualquer outro modelo de peixe cultivado.

1.3 Teste de micronúcleo (MN)

O teste de MN foi desenvolvido originalmente por Schmid (1975). MN é um pequeno fragmento nuclear adicional, separado do núcleo principal, formado por cromossomos ou

fragmentos de cromossomos que não foram unidos ao núcleo principal durante a mitose (CARRARD *et al.*, 2007).

MNs são formados através de alterações estruturais cromossômicas espontâneas, mas também ocorrem devido a fatores ambientais ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, portanto, material genético excluído do novo núcleo na fase da telófase mitótica (CARRARD *et al.*, 2007; FURNUS *et al.*, 2014; SOUTO *et al.*, 2008).

Os MNs podem ser únicos ou múltiplos, apresentando estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal, formato arredondado com a borda evidente. Possuem diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal e estão localizados na região intracitoplasmática (CARRARD *et al.*, 2007; SOUTO *et al.*, 2008)

De acordo com Flores e Yamaguchi (2008), o teste do micronúcleo, sendo um teste citogenético, consiste na investigação de células previamente expostas a agentes químicos com a finalidade de detectar possíveis aberrações cromossômicas. O teste baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, utilizando-se para isso, preferencialmente, células de animais devidamente tratados.

As causas dessa variabilidade não estão claras, para tanto, são necessários mais estudos a fim de entendê-las. Ainda assim, a atuação de agentes clastogênicos/genotóxicos podem ser encarados como o reflexo para o aumento da fMNs em estudos controlados. O teste de micronúcleo é simples e sensível para organismos vivos, a avaliação do potencial genotóxico é simples e confiável (YADAV; TRIVEDI, 2009).

Durante as análises de micronúcleos, é possível observar a ocorrência de anormalidades nucleares. Essas anormalidades relacionam-se aos erros que ocorrem durante a mitose, com os processos de morte celular (necrose e apoptose) além da própria genotoxicidade e mutagenicidade (FENECH, 2000) que sugere as células com brotos nucleares como sendo as anormalidades recomendadas para serem analisadas.

Segundo Kirsch-Volders *et al.*, (2002) os brotos nucleares, assim como os “broken-eggs”, seriam o resultado do procedimento de expulsão do micronúcleo do núcleo principal da célula. Carrasco *et al.*, (1990) consideram outras anormalidades nucleares chamadas de “blebbed”, “lobed” e “notched”, tendo como possível causa a ação mutagênica. Núcleos “blebbed” apresentam uma pequena invaginação da membrana e da cromatina, enquanto que os “lobed” apresentam uma invaginação maior da membrana e da cromatina, formando lobos e o núcleo “notched” apresenta profundas invaginações ou ainda lacunas que não contém cromatina (VILCHES, 2009).

Diante da demanda excessiva do uso de agrotóxicos nos locais próximos aos pontos de coleta, ademais da intensa carga de efluentes industriais despejados nos cursos de água, levantamos a hipótese de que os contaminantes presentes no Rio Ijuí possuem potencial genotóxico para induzir eventos clastogênicos em nível de MN nos organismos eucariontes. Este trabalho tem por objetivos analisar alterações genotóxicas em peixes submetidos a água antropizada; determinar surgimento de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos do zebrafish; correlacionar os resultados entre os pontos pré-estabelecidos do Rio Ijuí estudados.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Artigo científico

Manuscrito de acordo com as normas da Revista Ambi-Água (Revista Ambiente e Revista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas) (Anexo A) que será encaminhado à publicação após apreciação da banca examinadora.

RESPOSTAS CITOTÓXICAS DO ZEBRAFISH FRENTE A TRATAMENTO COM ÁGUA DOCE ANTROPIZADA.

RESUMO: Diversos são os motivos que podem levar a alteração da qualidade da água em um determinado ambiente aquático, os quais acarretam em inúmeras consequências para os organismos que a habitam. Os corpos de água localizados na região noroeste do Rio Grande do Sul recebem periodicamente cargas de substâncias que podem conter propriedades genotóxicas, citotóxicas e mutagênicas que afetam a integridade genética desses organismos. Este trabalho teve como objetivo analisar as respostas citológicas do *Danio rerio* quando exposto a tratamento com a água doce antropizada do Rio Ijuí. Para tanto foi usado o teste de micronúcleo e anormalidades nucleares em 3.000 eritrócitos por indivíduo. Os resultados do teste de micronúcleo (MN) não foram estatisticamente significativos, sugerindo que os contaminantes presentes no rio não possuem potencial genotóxico para o aparecimento de MN, mas sim potencial clastogênico que induz anormalidades nucleares (AN).

Palavras-chave: Micronúcleo. Anormalidades Nucleares. Respostas citológicas.

ABSTRACT: Several factors can lead to alterations of the water quality in aquatic environments, which has numerous consequences for the organisms that inhabit it. The water bodies located in the northwest region of Rio Grande do Sul periodically receive loads of substances that may contain genotoxic, cytotoxic and mutagenic properties, which affect the genetic integrity of living organisms. This research aimed to analyze the cytological responses of *Danio rerio* when exposed to treatment with anthropized fresh water from the Ijuí River, RS, Brazil. The micronucleus and nuclear abnormalities test in 3,000 erythrocytes per individual was used. The results of the micronuclei test (MN) were not statistically significant, suggesting that river contamination has no genotoxic potential for the emergence of MN, but clastogenic potential that induces nuclear abnormalities (NA).

Keywords: *Danio rerio*. Micronuclei. Nuclear abnormalities, Cytological responses.

2.2 INTRODUÇÃO

O censo demográfico realizado pelo IBGE em 2010, aponta que o Brasil teve um acréscimo populacional aproximado de 20 vezes em relação ao ano de 1872 (BRASIL, 2011). Diante do aumento populacional descontrolado é essencial maiores taxas de produção agrícola para suprir as necessidades da demanda de alimento, logo é preciso produzir mais.

Esse alto índice de produção é obtido através de diversos métodos sendo um deles, sem dúvida o mais debatido na atual década, o uso abusivo de agrotóxicos. De acordo com o ministério da agricultura, pecuária e abastecimento os agrotóxicos são definidos como substâncias físicas, químicas ou biológicas que visam alterar a composição da fauna e da flora, com o objetivo de “defesa” contra organismos considerados nocivos para o bom desenvolvimento da planta (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002).

Um dos destinos desse agrotóxico, principalmente em períodos de chuvas, são os córregos e rios localizados próximos a grandes terrenos onde é realizado o plantio e colheita de grãos. De acordo com Spadotto *et al.*, (2004) a lixiviação dos agrotóxicos tende a acarretar a contaminação das águas subterrâneas, e, nesse caso, as substâncias químicas são carreadas em solução juntamente com a água chegando aos aquíferos. Para tanto, os recursos hídricos caracterizam-se por ser o destino final de alguns agrotóxicos levando à contaminação desses mananciais. (KASPER *et al.*, 2018)

Em ecossistemas aquáticos os testes mais utilizados como biomarcadores em organismos como peixes são os testes de micronúcleo (MN) e de anormalidades nucleares (AN) em eritrócitos periféricos desses organismos. Reconhecido mundialmente por agências e instituições governamentais, sendo um dos métodos preferenciais para avaliar o dano genético em organismos, o teste de MN permite detectar danos provenientes tanto de agentes clastogênicos, responsáveis por quebras cromossômicas, como de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ANSARI *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foi usado o *Danio rerio* como organismo para os testes. Conhecido popularmente por zebrafish, paulistinha ou peixe zebra, é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), cipriniforme, da família dos ciprinídeos, tropical de água doce, que nos últimos anos vem atraindo a atenção da comunidade científica por apresentar algumas características importantes para o seu uso em laboratório tais como seu pequeno tamanho, resistência, rápida reprodução e genéticas semelhantes aos mamíferos (BARBAZUK, *et al.*, 2000)

De acordo com a SEMA, o Rio Ijuí, localiza-se na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas 28°00' a 29°05' de latitude Sul e 53°11' a 55°21' de longitude Oeste surge através da união dos rios Palmeira, Caxambu e Fiúza, próximo ao município de Panambi – RS. É o principal rio da bacia que leva o seu nome, possui área de 10.703,78 km² onde inserem-se 36 municípios, onde existe diversas atividades econômicas, sendo principalmente dominado pela presença de indústrias, além de extensas áreas agrícolas com intensa produtividade de grãos. A bacia está constituída por mais 12 rios que cortam cidades e áreas agrícolas, até desaguar diretamente no Rio Ijuí.

Diante da demanda excessiva do uso de agrotóxicos nos locais próximos aos pontos de coleta, ademais da intensa carga de efluentes industriais despejados nos cursos de água, levantamos a hipótese de que os contaminantes presentes no Rio Ijuí possuem potencial genotóxico para induzir eventos clastogênicos em nível de MN nos organismos eucariontes. Este trabalho tem por objetivos analisar alterações genotóxicas em peixes submetidos a água antropizada; determinar surgimento de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos do zebrafish; correlacionar os resultados entre os pontos pré-estabelecidos do Rio Ijuí estudados

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Manutenção dos peixes

Os espécimes de zebrafish utilizados neste trabalho foram obtidos através do comércio local de Cerro Largo – RS sendo 10 exemplares por teste, totalizando 40 peixes. Os peixes foram aclimatados durante uma semana em aquários com capacidade de 20 litros - sendo 10 espécimes por aquário - no laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFFS – Cerro Largo/RS. Após uma semana de aclimação, foram submetidos por 96 horas na água coletada nos quatro diferentes pontos do rio Ijuí. Os peixes foram alimentados *ad libitum* sob condições controladas de temperatura e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) como preconiza a normativa nº 34 do CONCEA.

2.3.2 Área de amostragem

Inicialmente foram escolhidos quatro pontos do Rio Ijuí que para coleta da água que foi utilizada para os testes com o bioindicador escolhido.

Os quatro pontos de coleta foram escolhidos por sugerir alta antropização e contaminação urbana e agrícola das águas.

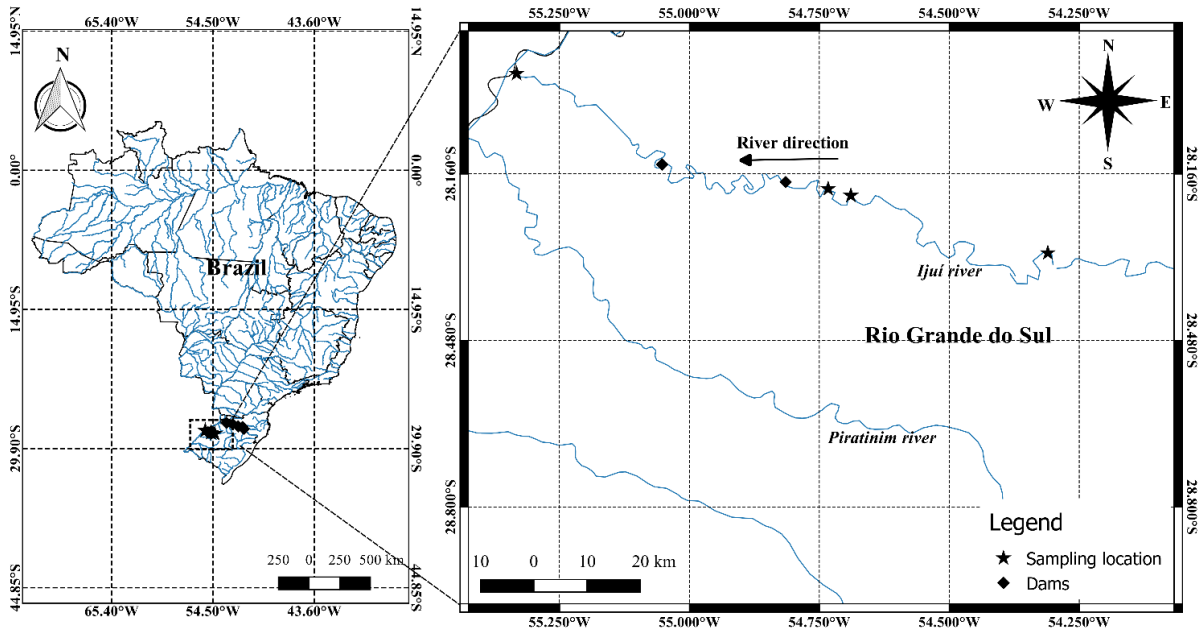
P1– Localizado sob as coordenadas 28°18'50.74" S e 54°18'38.39" W, após a cidade de Santo Ângelo-RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar e por receber descarga de efluente industrial e urbano através dos afluentes que cortam a cidade.

P2 – Localizado sob as coordenadas 28°11'53.20" S e 54°41'25.47" W, próximo a cidade de Cerro Largo -RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar e por estar próximo a áreas de criação de suínos e bovinos de corte e leite, além de anteriormente ter percorrido por extensas áreas agrícolas. Esse ponto ainda antecede um barramento devido a presença de uma hidrelétrica, sendo caracterizado como um ecossistema lótico.

P3 - Localizado sob as coordenadas 28°11'19.26" S e 54°43'58.56" W, no interior da cidade de Cerro Largo - RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar, possuindo área de criação de bovinos de corte e leite, além de ser percorrido por extensas áreas agrícolas. Esse ponto localiza-se no barramento da Usina Hidrelétrica São José - Ijuí Energia S.A, sendo caracterizado como um ecossistema lêntico.

P4 - Localizado sob as coordenadas 27°58'0.62"S e 55°19'57.82"W, na cidade de Roque Gonzales- RS. O ponto caracteriza-se pela inexistência de mata ciliar, possuindo forte atividade pecuária nas proximidades. Esse ponto localiza-se na foz do Rio Ijuí que desemboca no Rio Uruguai.

Figura 1: Localização dos pontos de coleta.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

2.3.3. Confeção dos esfregaços sanguíneos

Após o período de exposição, os animais foram sedados e eutanasiados conforme método aprovado pelo CEUA/n° 589216051 e coletado sangue através da punção da artéria caudal através de capilares de vidro com EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) como anticoagulante. Após a coleta, fez-se a confecção de esfregaço sanguíneo em uma lâmina, previamente limpa, tendo como premissa confeccionar uma lâmina por peixe, dado ao fato de que a espécie é muito pequena e o volume de sangue é mínimo. Após a secagem do esfregaço em temperatura ambiente apropriadamente acondicionados em tubos plásticos específicos para lâminas, as mesmas foram submersas em metanol absoluto (100%) por 20 minutos, para a fixação do material biológico.

As carcaças dos animais foram congeladas e alocadas para coleta de descarte biológico por empresa que atende a UFFS.

2.3.4. Coloração dos esfregaços sanguíneos

A metodologia de confecção das lâminas de micronúcleo (MN) seguiu o protocolo descrito por Feulgen adaptado, com coloração em Schiff e Fast-Green para contra-coloração.

Após a fixação, foi feita a hidrólise em HCl 5N por 15 minutos, com posterior lavagem em água destilada, colocado para corar em reativo de Schiff por duas horas no escuro e novamente lavado em água destilada. Em seguida, as lâminas foram embebidas em corante Fast-Green por um minuto e novamente lavado em água destilada e posto para secagem para posterior análise.

2.3.5. Contagem dos eritrócitos e análise das observações

Foi realizada a observação e análise das lâminas em microscópio óptico com lente de aumento máximo de 1000x. Para cada peixe foram contabilizadas 3.000 células e verificada a presença de MN e AN (Figura 3). As AN foram classificadas em cinco tipos segundo Carrasco, Tylbury & Myers (1990); Ramirez (2000):

- a) Bebbled: que apresentam uma pequena invaginação na membrana e na cromatina;
- b) Lobbed: que apresentam uma invaginação maior da membrana e da cromatina em relação ao bebbled;
- c) Notched: apresenta uma invaginação profunda na cromatina;
- d) Vacuolated: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior;
- e) Cariorrexe: alteração celular que envolve a fragmentação e a degeneração do núcleo, levando à morte celular

Para análise dos resultados foi escolhido o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de testes não foi registrada nenhuma morte ou comportamento anormal dos peixes.

As análises dos parâmetros físico-químicos da água tanto dos pontos quanto do controle estão expressas na Tabela 1 e como podemos verificar não mostraram diferenças em relação ao controle e segundo a resolução nº 357 (CONAMA, 2005)

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água dos quatro pontos no momento da coleta e no final do tratamento dos zebrafish.

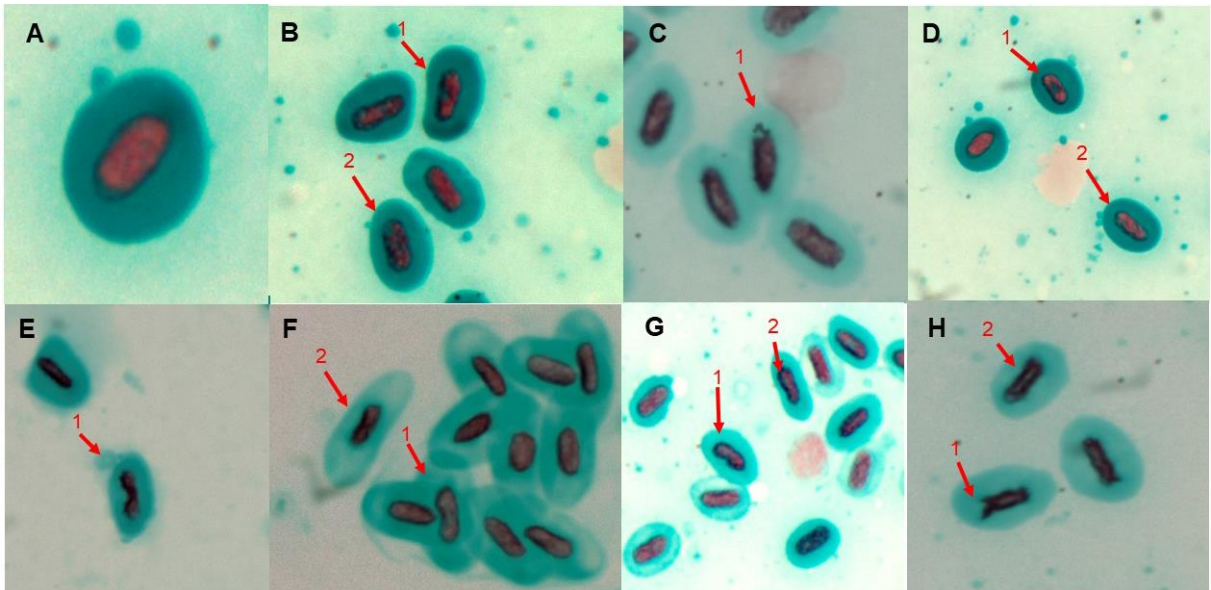
Parâmetro	Controle	Ponto 1		Ponto 2	
		Coleta	Final/Trat.	Coleta	Final/Trat.
pH	8.42	7.4	8.2	8	7.7
Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	282.0	95.9	230.0	62.3	167.2
ODi (mg/l)	9.9	5.9	9.7	8.4	5.1
Temp. Da água ($^{\circ}\text{C}$)	22.5	17.2	22.5	14.9	27.4
Temp. Ambiente ($^{\circ}\text{C}$)	24	19	24	16	28
Característica		Ponto 3		Ponto 4	
		Coleta	Final/Trat.	Coleta	Final/Trat.
pH		7.5	7.9	7.2	7.3
Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		57.4	284.0	63.3	140.2
ODi (mg/l)		5.9	11.3	6.6	12.8
Temp. Da água ($^{\circ}\text{C}$)		19.2	24.1	19.3	22
Temp. Ambiente ($^{\circ}\text{C}$)		22	20	22	24

*ODi=oxigênio dissolvido; COND=condutividade. Trat.= tratamento.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

Na figura 2 estão representadas as anormalidades nucleares que foram encontradas nos eritrócitos analisados.

Figura 2. Imagens das anormalidades encontradas em eritrócitos sanguíneos de *Danio rerio* submetidos às águas de quatro pontos do rio Ijuí.



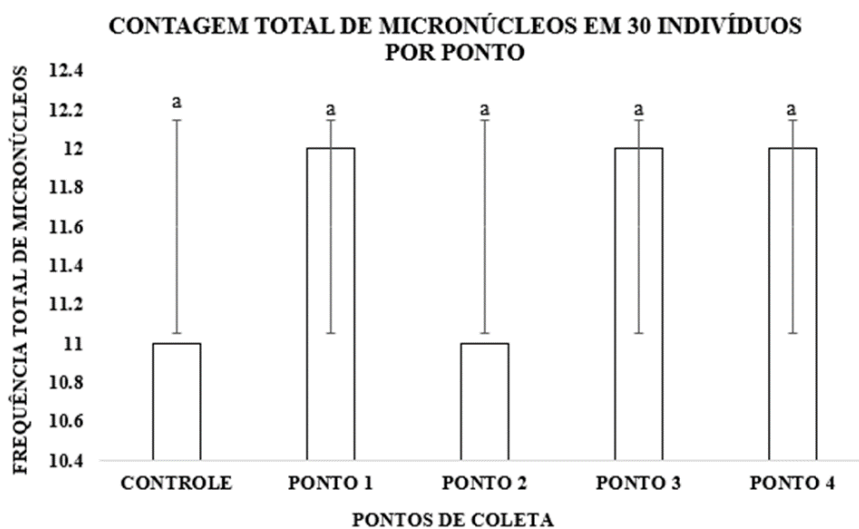
Legenda: (A) Eritrócito Normal; (B) 1- Notched; 2- Cariorréxis; (C) 1 - Desprendimento cromossômico – Micronúcleo; (D) 1 –Vacuolated; 2- Cariorréxis; (E) 1 – Lobbed; (F) 1 – Lobbed; 2 – Blebbed; (G) 1 – Notched; 2– Blebbed; (H) 1 - Desprendimento cromossômico – Micronúcleo; 2 – Blebbed.

Fonte: Autor, 2019.

Nas Figuras 3 e 4 estão expressos os valores encontrados de MN e AN, respectivamente, de zebrafish analisados e submetidos ao teste estatístico.

Figura 3. Valores totais de micronúcleo dos zebrafish do controle e dos testes submetidos ao teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.

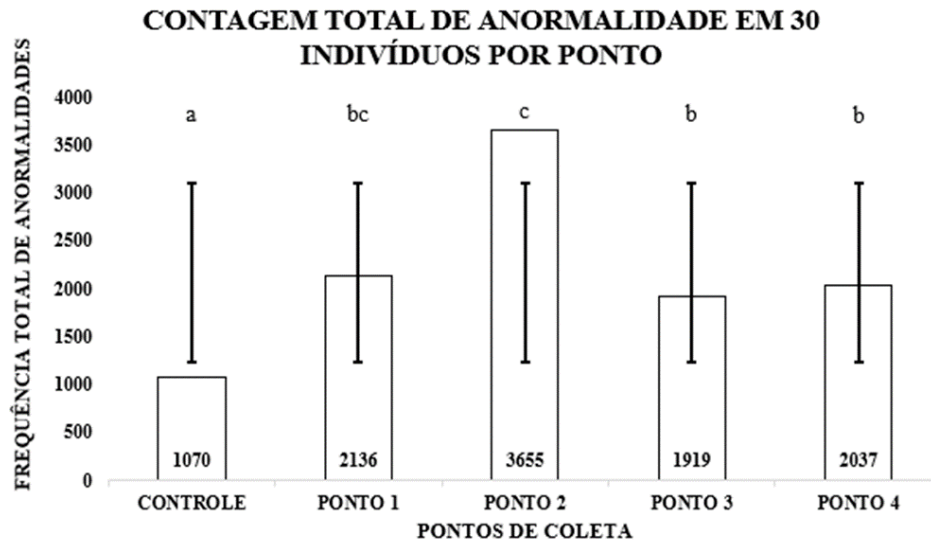
*valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 4. Valores totais de anormalidades dos zebrafish do controle e dos testes submetidos ao teste de Kruskal Wallis ao nível de 5% de significância.

*valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Efluentes industriais e de origem agropecuária costumam ter substâncias clastogênicas em sua composição, os quais são causadores da quebra cromossômica ou de disfunções dos fusos mitóticos o que acarreta no aparecimento de MN (THOMÉ, et al., 2016). Contudo, os valores registrados nos testes dos quatro pontos não foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle para demonstrar que a poluição nas águas do Rio Ijuí cause alterações genéticas em nível de MN que se caracteriza por ser um dano não mais passível de reparo.

A média de aparecimento de MN nos testes foi relativo de 0.4 – 0.3 a cada 1000 células. De acordo com Thomé et al., (2016) valores que são iguais ou não ultrapassam 1 MN por 1000 células são relatados como ocorrência de origem endógena dos organismos.

Os dados de MN não foram estatisticamente significativos, entretanto o aparecimento dessa alteração é um evento não passível de mecanismo de reparo, desta forma os eventos que precedem o estabelecimento de MN estão evidenciados nos valores de AN.

O teste de MN possibilita detectar efeitos genotóxicos provocados por diversos fatores que os organismos podem estar expostos em seus habitats, sendo um teste de simples aplicação. Porém, o MN só é passível de ser detectado, caso o sistema de reparo não seja capaz de agir em casos extremos. Por fim, o teste permite detectar danos provenientes tanto de agentes clastogênicos, responsáveis por quebras cromossômicas, como de agentes aneugênicos que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (ANSARI et al., 2011) e no caso o protocolo tem potencial para analisar eventos que precedem o surgimento de MN.

De acordo com a Figura 4, os peixes expostos ao tratamento com as águas dos quatro pontos do rio apresentaram aumento de anormalidades nucleares em relação aos peixes submetidos ao teste controle. É possível perceber um significativo aumento no desenvolvimento de AN no grupo de peixes do ponto 2.

Outro tópico importante a ser observado é o fato do ponto 3 possuir uma característica diferente dos demais, trata-se do ecossistema lântico. Conquanto esse fator não mostrou ser

determinante no resultado final do número de AN quando comparado aos demais pontos caracterizados como ecossistemas lóticos (Ponto 1 e 4).

Vale ressaltar a diferença no número de anormalidades entre os pontos 2 e 3, visto que os mesmos estão localizados no mesmo município e possuem a menor distância entre si em relação aos demais pontos. De acordo com Thomé, et al., (2016), um rio possui potencial de autopurificação, ou seja, quando ocorre o despejo e entrada de efluentes provenientes da ação humana, os rios e demais cursos d'água possuem a aptidão de restabelecer suas características naturais na tentativa de alcançar a autopurificação.

Diversas características podem interferir na autopurificação de um rio, dentre eles está a profundidade média, velocidade do curso d'água, largura e concentração de oxigênio dissolvido, e ainda, Von Sperling (2005) descreve que em um curso de água é possível haver segmentações divididas em zonas de autopurificação, ou seja, no percurso há a variação entre águas limpas que antecedem a zona de despejo de efluentes e que, após esse ponto, um novo trecho de recuperação das águas onde prevalece a introdução de oxigênio dissolvido no ecossistema aquático, e logo após têm-se novamente a zona de águas limpas, desta forma podemos inferir que substâncias clastogênicas presentes no ponto 2 não estão sendo carregadas para o trecho do ponto 3.

Levando em consideração que diversas espécies de peixes possuem fundamental importância tanto para as cadeias alimentares quanto para ingestão humana, estes acabam sendo utilizados em larga escala como bioindicadores. Ademais, o fato deles responderem à contaminação que são expostos de uma maneira muito rápida e com similaridade aos mamíferos, mesmo em pequenas concentrações de substâncias tóxicas, o zebrafish, se torna excelente modelo laboratorial para o estudo do potencial clastogênico dos efluentes resultantes da ação humana (THOMÉ, et al., 2016).

4 CONCLUSÕES

A água do Rio Ijuí, coletada em todos os pontos analisados mostrou potencial para induzir eventos clastogênicos no modelo zebrafish. Entretanto, não houve evidência de potencial genotóxico com surgimento de MN.

Os dados coletados de células com AN, indicam que seus valores são maiores que o índice de células com MN sugerindo que as células tiveram eficiência no mecanismo de reparo nesses organismos.

5 REFERÊNCIAS

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. *In vivo* cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, p. 50-156, 2011.

BARBAZUK, W.B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J.A.; MCPHERSON, J.D.; JOHNSON, S.L. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes.** *Genome research*, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000

BRASIL, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Normativas do CONCEA.** 3º edição. Brasília, 2016.

BRASIL. Decreto n. 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 8 jan. 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em maio de 2019.

BRASIL, Governo. **Censo 2010: população do Brasil cresce quase 20 vezes desde 1872.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2011/04/censo-2010-populacao-do-brasil-cresce-quase-20-vezes-desde-1872>>. Acesso em maio de 2019.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 12 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm>. Acesso em maio de 2019.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S.; Assessment os the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminats effects. **Canad. Journ. of Fish. and Aquatic Scienc.** 47, p. 2123-2136, 1990.

FLORES, Monica; UEDA YAMAGUCHI, Mirian. Teste do micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 337–340, 2008.

KASPER, Natan et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente e Agua**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 445–458, 2018.

MACEDO, Carla Fernandes; SIPAÚBA-TAVARES, Lúcia H. Eutrofização E Qualidade Da Água Na Piscicultura : Consequências E Recomendações Eutrophication and Water Quality in Pisciculture : Consequences and Recommendations. **Bol. Inst. Pesca**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 149–163, 2010.

RAMIREZ, Andrea. **Análise de Células Metanucleadas de Alcoólicos Portadores de Carcinomas Orais.** [s. l.], 2000.

ROMEIRO, Ademar Ribeiro; GARCIA, Junior Ruiz; PEIXOTO, Marcus. **Trabalho rural: tendências em face das transformações em curso.** [s.l: s.n.].

SEMA - Secretária do Meio Ambiente e Infraestrutura. **U090 - Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí.** Disponível em: <<https://www.sema.rs.gov.br/u090-bacia-hidrografica-do-rio-ijui>>. Acesso em maio de 2019.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática.** 2004, p. 80. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SPADOTTO, C.A. *et al.* **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p.

THOMÉ, Ralph Gruppi; SILVA, Priscyla Martins; SANTOS, Hélio Batista. Avaliação de genotoxicidade da água de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de Danio rerio. **Conexão Ciência (Online)**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 9–16, 2016.

VILCHES, M. Análise genotóxica do rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores. **Novo Hamburgo: Centro universitário Feevale**, [s. l.], 2009. Disponível em: <<http://www.feevale.br/site/files/documentos/pdf/28073.pdf>>. Acesso em outubro de 2019.

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. v. 1. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3º ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, v. 1. p 452, 2005.

3. REFERÊNCIAS

- AMSTERDAM, A, HOPKINS, N: Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. **Trends Genet** 22:473–478 (2006).
- BARBAZUK, W.B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J.A.; MCPHERSON, J.D.; JOHNSON, S.L. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes**. **Genome research**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000
- BRASIL. Decreto n. 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 8 jan. 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm. Acesso em: 14 mai. 2019.
- BRASIL, Governo. **Censo 2010: população do Brasil cresce quase 20 vezes desde 1872**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/governo/2011/04/censo-2010-populacao-do-brasil-cresce-quase-20-vezes-desde-1872>. Acesso em 14 de mai. de 2019.
- BRASIL. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 12 jul. 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm. Acesso em: 14 mai. 2019.
- CARRARD, V. *et al.* Micronucleus Assay – A Biomarker Of Genotoxic Damage In Exfoliated Oral Mucosa Cells. **Revista Faculdade Odontológica Porto Alegre**, [s. l.], v. 48, n. 1/3, p. 77–81, 2007.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.** 455, p. 81-95, 2000
- FLORES, Monica; UEDA YAMAGUCHI, Mirian. Teste do micronúcleo: Uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 337–340, 2008.
- FURNUS, G. *et al.* Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 217–221, 2014.
- GRUNWALD, DJ; EISEN, JS. Head waters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate. **Nat Rev Genet** 3:717–724 (2002).
- KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug disco: very. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Saint Louis, v. 82, n. 1, p. 70-80, July 2007.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; BOECK, M. D.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat. Res.** 504, p. 137-148, 2002.
- LIESCHKE, G.J., CURRIE, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews and Genetics** 8 (5), 353–367
- LINS, José Augusto Pereira Navarro *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 469, 2010.
- MACEDO, Carla Fernandes; SIPAÚBA-TAVARES, Lúcia H. Eutrophication and Water Quality in Pisciculture : Consequences and Recommendations. **Bol. Inst. Pesca**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 149–163, 2010.

NETO, M. L. F.; FERREIRA, A. P. - Perspectivas da Sustentabilidade Ambiental Diante da Contaminação Química da Água: Desafios Normativos - **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente** - v.2, n.4, Seção 1, ago 2007.

PRIMEL, E.G. *et al.* Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande Do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v.28, n.4, p.605-609, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010-40422005000400010&script=sci_arttext. Acesso em: 10 jun. 2019. doi: 10.1590/S0100-40422005000400010.

ROMEIRO, Ademar Ribeiro; GARCIA, Junior Ruiz; PEIXOTO, Marcus. **Trabalho rural: tendências em face das transformações em curso**. [s.l: s.n.].

RUBINSTEIN, AL: Zebrafish: from disease modelling to drug discovery. **Curr Opin Drug Discov Devel** 6:218–223 (2003).

SCHMID, W. : O teste de micronúcleos. **Mutat. Res.** 31 , 9–15 (1975)

SOUTO, R. *et al.* O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Estudos Goiânia**, [s. l.], v. 35, n. 1/2, p. 171–178, 2008.

SPADOTTO, C.A. *et al.* **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p

TUNDISI, J.G. 2003 A crise da água: eutrofização e suas consequências. *In.* TUNDISI, J.G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. Rima, IIE, São Carlos. 247p.

VASCOTTO SG, Beckham Y, Kelly GM: The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. **Biochem Cell Biol** 75:479–485 (1997).

VILCHES, M. Análise genotóxica do rio cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores. **Novo Hamburgo: Centro universitário Feevale**, [s. l.], 2009. Disponível em: <http://www.feevale.br/site/files/documentos/pdf/28073.pdf>. Acesso em 05 out. 2019.

YADAV, K. K.; TRIVEDI, S. P. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 77, n. 11, p. 1495–1500, 2009.

ZORZETTO, Ricardo. Pesquisa Fapesp. **Um peixe modelo**. Disponível em <https://revistapesquisa.fapesp.br/2013/07/12/um-peixe-modelo/>. Acesso em: 15 mai. 2019.

4. ANEXOS

Forma e preparação dos manuscritos

I - Os manuscritos submetidos devem ser originais, destinados exclusivamente à Ambi-Água (Revista Ambiente e Revista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas).

II - A partir de janeiro de 2017, somente serão aceitas inscrições em inglês.

Todas as submissões devem ser via sistema, após ler atentamente todas as instruções e registrar-se em:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/ambiagua-scielo>

III - Os manuscritos direcionados a esta revista serão avaliados pelo Comitê Editorial e Revisores por Pares, de acordo com a sua especialidade, seguindo os seguintes critérios:

- a) Interesse científico internacional;
- b) conteúdo técnico científico;
- c) relevância científica;
- d) Clareza e qualidade do texto;
- e) Qualidade e adequação do conteúdo teórico.

Por favor, esteja ciente de que será considerado não ético retirar uma submissão antes da decisão final do Comitê Editorial.

IV - Em cada edição, o Comitê Editorial selecionará, dentre os manuscritos favoráveis, aqueles que serão publicados com base nos critérios acima. Não há compromisso com a sequência de envio ou o tempo para uma decisão editorial. Isso depende da resposta do revisor e do autor e também das tarefas e limitações de administração.

Formatação do texto:

O manuscrito deve ser submetido em formato de texto (MS Office), sem restrição de senha para permitir a edição. A publicação final será em pdf, epdf, html e xml. O manuscrito deve ser submetido com as seguintes características:

Idioma: Bom Inglês (Americano ou Britânico)

Tamanho da página: equivalente ao tamanho da folha A4 (210 x 297 mm);

Margens (superior, inferior, esquerda e direita): 2,5 cm;

Tipo de fonte: Times New Roman, 12, espaço único entre linhas, em uma única coluna, parágrafos alinhados à esquerda e à direita;

Tamanho do manuscrito: o mais importante na avaliação é a qualidade e contribuição científica da submissão. Normalmente, espera-se que um manuscrito tenha no máximo 10 páginas, incluindo tabelas e figuras (máximo de cinco no total).

Manuscritos mais longos são aceitos, no entanto, páginas adicionais serão cobradas, contadas após o manuscrito ter sido aceito para publicação e layout prontos.

Todos os manuscritos também devem ter uma versão em português do título, resumo e palavras-chave.

Primeira página: deve conter apenas o título do manuscrito, sem o nome dos autores, afiliação institucional ou e-mail, seguido de resumo e palavras-chave, separados por “dois pontos” e um período no final.

Tabelas e Figuras: devem ser numeradas com números arábicos consecutivos, citados no texto imediatamente antes de aparecer no manuscrito (primeira letra em maiúscula). Portanto, eles devem aparecer no texto exatamente como o formato final dos artigos publicados (verifique os artigos publicados anteriormente). A legenda das figuras deve aparecer na parte inferior com a primeira letra maiúscula, um espaço de um caractere, seguido pelo número do pedido, um ponto (um ponto) e um espaço (por exemplo, **Figura 1.** O solo seco...). Os títulos das tabelas devem aparecer acima e precedidos pela palavra

tabela (observe a primeira letra maiúscula), um espaço, ordem numérica, um ponto e espaço de um caractere (por exemplo, **tabela 1.** Concentrações de poluentes ...). Sempre que figuras e

tabelas tiverem uma fonte de referência, a palavra “Fonte:” deverá aparecer na parte inferior, seguida pela referência da fonte. Os textos de tabelas, figuras e fontes sempre terminam com ponto (um ponto). As figuras podem ser coloridas, com boas resoluções (300 dpi), no entanto, os autores devem explorar todas as possibilidades para reduzir o tamanho da memória do manuscrito, mas preservando a qualidade das figuras.

Você pode inserir imagens no artigo sem aumentar o tamanho do arquivo, basta seguir as dicas abaixo: Use arquivos de imagem nos formatos JPG, PNG ou GIF. Esses arquivos geralmente têm bons padrões de qualidade e não consomem muito espaço em disco e memória; Para inserir as figuras no texto, não use copiar / Colar (ou Ctrl + C /Ctrl + V);

Salve as imagens no seu computador que você deseja inserir no documento;

Em seguida, vá para a opção de menu disponível para inserção da imagem do seu editor de texto (por exemplo, no MSWord, selecione Inserir / Imagem / Do arquivo) e localize a imagem que deseja inserir no documento. Por fim, insira a imagem selecionada no texto.

Essas dicas serão úteis para que o manuscrito seja enviado com sucesso.

É essencial que as tabelas sejam em formato de texto, não como uma figura ou imagem. Verifique se eles podem ser editados. Verifique se as colunas foram editadas como colunas e não separadas por espaço ou tabulação. Todas as colunas devem ter um título. Envie uma cópia adicional das tabelas no Excel. As figuras devem ter textos legíveis, usando letras maiúsculas/minúsculas, conforme apropriado e com alta resolução. Não use títulos na parte superior. Certifique-se de que eles permitam edições.

Estrutura dos manuscritos : os manuscritos em INGLÊS devem ter a seguinte sequência: TITLE em inglês, seguido de um RESUMO (seguido de três palavras-chave, em ordem alfabética, que não replicam as palavras do título ou aparecem no resumo); Título do manuscrito em português; Resumo em português (seguido de palavras-chave, em ordem alfabética, em português); 1. INTRODUÇÃO (incluindo revisão de literatura); 2.

MATERIAIS E MÉTODOS; 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO; 4. CONCLUSÕES; 5. AGRADECIMENTOS (se for o caso, inclua apenas o reconhecimento às agências financiadoras, incluindo o número da doação); e 6. REFERÊNCIAS (utilize referências de periódicos de alto impacto, não utilize simpósios, teses e dissertações, a menos que sejam absolutamente essenciais e em número limitado). Veja o "Formulário de Avaliação" (http://www.ambiagua.net/seer/files/review_form.doc) para verificar o conteúdo esperado de cada seção. Verifique os artigos já publicados para ver quais textos devem estar em negrito.

UNIDADES

Medir unidades: use unidades internacionais com um espaço após o número (por exemplo, 10 km h⁻¹, não km / h, verifique a consistência do texto), exceto% (por exemplo, 10%) e grau (por exemplo, oC). Verifique com cuidado todos os caracteres e figuras gregos. Soletre os números de um a nove, exceto quando usados em

unidades. Deixe um espaço único entre as unidades: g L⁻¹, e não gL⁻¹, nem gL – 1.

Use o sistema de tempo de 24 horas, com quatro dígitos por horas e minutos: 09h00; 18h30.

Títulos (RESUMO, 1. INTRODUÇÃO, 2. MATERIAIS E

MÉTODOS, etc.): Use letras maiúsculas, 14, negrito, alinhadas à esquerda.

Legendas: se necessário, serão escritas com letras maiúsculas iniciais, precedidas de dois números arábicos, separadas e seguidas de um ponto 12, negrito, alinhado à esquerda.

Resumo: deve conter objetivos, metodologia, resultados e conclusões, deve ser composto por uma sequência de frases em um único parágrafo com no máximo 250 palavras.

Citações: No texto, as citações devem seguir as recomendações da ABNT-NBR 10520 com as seguintes especificidades: Sobrenome do autor mencionado apenas com a primeira letra maiúscula, seguido do ano entre parênteses, quando o autor faz parte do texto. Quando o autor não faz parte do texto, entre parênteses, coloque o sobrenome, seguido pelo ano, separado por vírgula. Quando houver mais de um autor, seus sobrenomes serão separados por "e". As

referências citadas devem ser preferencialmente publicadas recentemente na base SciELO (www.scielo.br ou www.scielo.org) ou em periódicos internacionais de alto impacto. De preferência, não cite mais de 15 referências.

Equações: Gráficos e figuras originados no MS Excel devem ser inseridos como objetos que podem ser editados. O mesmo para as Equações (use o editor de Equações, de preferência usando o MS Word 2010 ou mais recente ou use o MathType) que deve ser inserido como objeto, não como imagem e numerado (parênteses).

Os autores devem expressar as equações da maneira mais simples possível. Eles devem incluir apenas as equações necessárias, para que um leitor comum possa entender a base técnica do manuscrito. Os manuscritos não devem ter notação matemática excessiva.

Nota importante para os manuscritos em inglês: todos os manuscritos escritos devem ser enviados em inglês. Os autores que não têm o inglês como primeira língua devem ter seus manuscritos revisados por um profissional com bom conhecimento de inglês para revisar o texto (vocabulário, gramática e sintaxe). As submissões podem ser rejeitadas com base na inadequação do texto sem exame de seu mérito científico.

Exemplos de como citar referências no texto: Jones (2015), Jones e Smith (2009) ou (Jones, 2015; Jones e Smith, 2009), dependendo da construção da frase. Mais de dois autores: Jones et al. (2014) ou (Jones et al., 2014). Comunicações pessoais ou referência não publicada não devem ser incluídas na lista de referências, mas no texto, entre parênteses (Jones, comunicação pessoal, 2015).

Lista de Referências: Deve seguir as recomendações da ABNTNBR 6023, aqui exemplificadas:

Livros: FALKNER, E. **Mapeamento Aéreo:** métodos e aplicações. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 322 p. Observe que a cidade e o editor da publicação são importantes!

Capítulos de livros: WEBB, H. Criação de modelos digitais de terreno usando fotogrametria analítica e seu uso em engenharia civil. In: **Modelagem de terrenos em topografia e engenharia civil.** Nova York: McGraw-Hill, 1991. p.73-84.

Revistas científicas: MEYER, MP Local de fotografia aérea de pequeno formato em pesquisas de recursos. **Journal of Forestry**, Washington, v. 80, n. 1, p. 15-17, 1982.

Manuscritos apresentados em eventos (Artigo impresso) – Essas referências devem ser evitadas, mas se essenciais: DAVIDSON, JM; RIZZO, DM; GARBELOTTO, M.; TJOSVOLD, S.; SLAUGHTER, GW *Phytophthora ramorum* e morte súbita de carvalho na Califórnia: II Transmissão e sobrevivência. Em: SIMPÓSIO EM CARVALHOES DE CARVALHO: CARVALHOS NA PAISAGEM EM MUDANÇA DA CALIFÓRNIA, 5. 23-25 de outubro de 2001, San Diego,

Proceedings ... Berkeley: USDA Forest Service, 2002. p. 741-749.

Manuscritos apresentados em eventos (eletronicamente) - devem ser evitados, mas se essenciais: COOK, JD; FERDINAND, LD 2001. Fidelidade geométrica das imagens de Ikonos. In: CONVENÇÃO ANUAL DA SOCIEDADE AMERICANA DE FOTOGAMETRIA E SENSORIO REMOTO, 23-27 de abril, St.Louis. **Proceedings...** St. Louis: ASPRS, 2001. 1 CD-ROM.

Teses e dissertações - devem ser evitadas - antes citam os artigos obtidos em revistas científicas: AFFONSO, AG **Caracterização de fisionomias vegetais na Amazônia oriental através de videografia aerotransportada e imagens LANDSAT 7 ETM +**, 2003, 120f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2003.

Sites na Internet (somente se absolutamente essenciais): Essas referências devem ser evitadas, mas essenciais ou se referem a um periódico publicado eletronicamente:

WORLD WILD LIFE FUND. **Ecorregiões.** 2004. Disponível em:

<<http://www.worldwildlife.org/science/ecoregions.cfm>>. Acesso em março de 2016.

Observe que todas as iniciais em nome do autor têm um espaço entre elas.

DIRETRIZES PARA SUBMISSÃO

O arquivo enviado (enviado) - o arquivo principal - **não deve conter nenhuma identificação dos autores**, portanto, sem o nome, afiliação ou email dos autores.

As propriedades do arquivo que identifica o autor devem ser removidas. Dicas para fazer isso:

Word 2010: Em Arquivo (arquivo morto), clique em **Informações, verificando problemas, inspecionar documento** e, nessa janela, clique em **Propriedades do documento e informações pessoais, Fechar e Salvar**.

Word 2003

Abra a guia **Opções**, clique em **Segurança** e elimine a propriedade do arquivo.

Todo o conteúdo dos artigos é de exclusiva responsabilidade dos autores.

Cada edição publicada pela Ambi-Agua apresenta uma imagem representativa de um artigo publicado nessa edição. Os autores são convidados a destacar na carta de apresentação que gostariam de ter uma figura específica a ser considerada como cientificamente interessante e visualmente atraente para a capa da revista. As imagens devem ter alta resolução (300 dpi) e 17 por 17 cm de tamanho. As imagens devem ser originais e os autores concedem à Ambi-Agua a licença para publicar. Carregue a imagem como um arquivo suplementar adicional. O autor deve possuir os direitos autorais da imagem enviada. De qualquer forma, os autores concedem à Revista Ambiente & Agua a licença para usar qualquer imagem publicada do manuscrito para ser usada como capa da edição, a menos que expressamente indicado o contrário.

5. APÊNCIDES

FIGURA 5: Ponto 1 localizado no município de Santo Ângelo.



Fonte: Acervo pessoal.

FIGURA 6. Ponto 2 localizado no município de Cerro Largo.



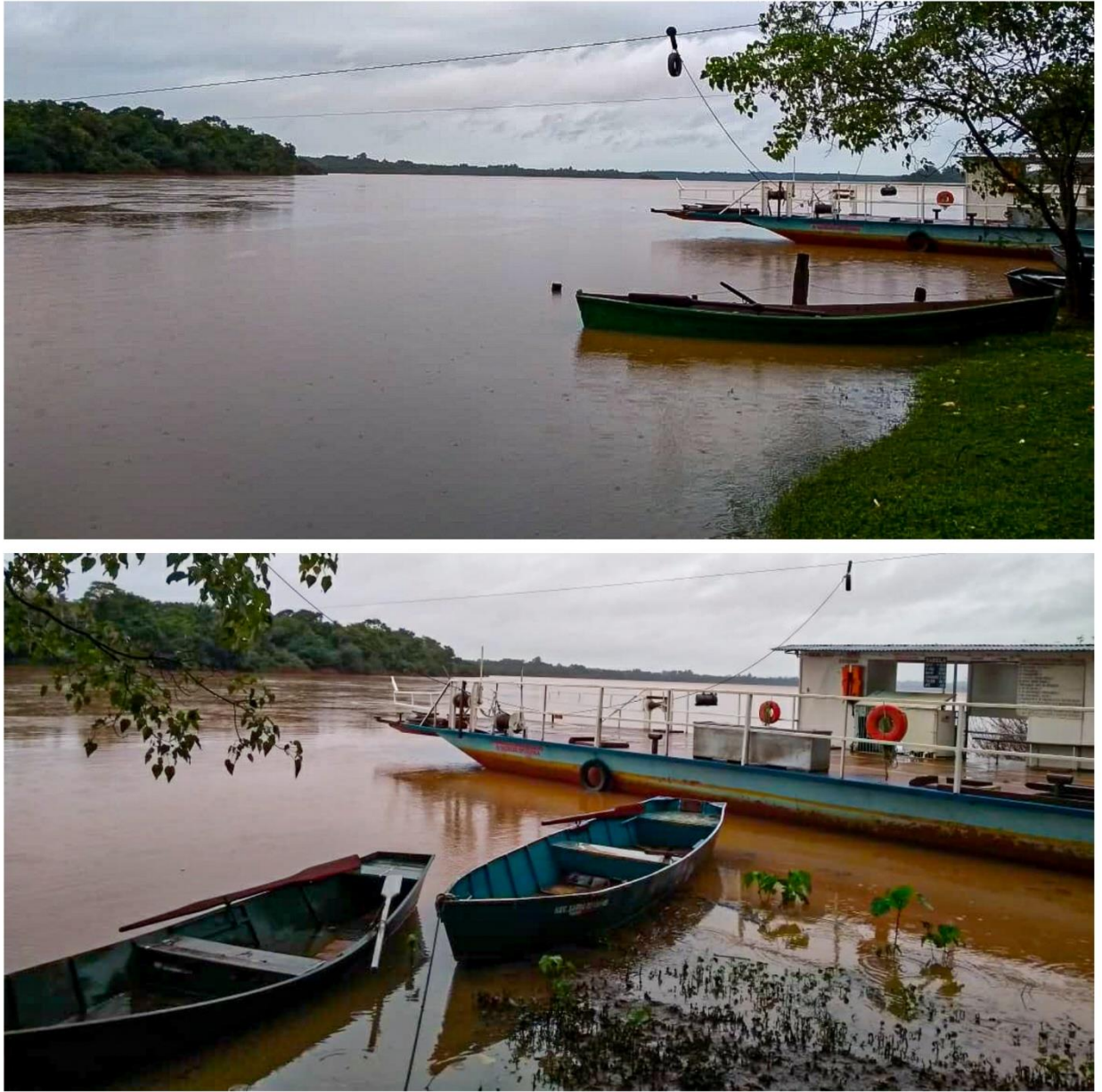
Fonte: Acervo pessoal.

FIGURA 7. Ponto 3 localizado no município de Cerro Largo.



Fonte: Acervo pessoal

FIGURA 8. Ponto 4 localizado no município de Roque Gonzales.



Fonte: Acervo pessoal.