



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CÂMPUS CENTRAL
ANÁPOLIS CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM RECURSOS NATURAIS DO
CERRADO

CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM

**MARCADORES GENÉTICOS E ENZIMÁTICOS DE PEIXES COMO
INDICADORES DA ANTROPIZAÇÃO DA PAISAGEM**

ANÁPOLIS-GO
FEVEREIRO DE 2020

CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM

**MARCADORES GENÉTICOS E ENZIMÁTICOS DE PEIXES COMO
INDICADORES DA ANTROPIZAÇÃO DA PAISAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado, da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Cerrado.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Barreto Teresa

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana de Souza Ondei

ANÁPOLIS – GO
FEVEREIRO DE 2020

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837m Cotrim, Carlos Filipe Camilo
Marcadores genéticos e enzimáticos de peixes como indicadores da antropização da paisagem / Carlos Filipe Camilo Cotrim; orientador Fabrício Barreto Teresa; co-orientador Luciana de Souza Ondeí. -- Anápolis, 2020.
67 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC)) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual de Goiás, 2020.

1. Biomarcadores. 2. Ecotoxicologia. 3. Estresse oxidativo. 4. Genotoxicidade. I. Teresa, Fabrício Barreto, orient. II. Ondeí, Luciana de Souza, co-orient. III. Título.

CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM

MARCADORES GENÉTICOS E ENZIMÁTICOS
DE PEIXES COMO INDICADORES DA
ANTROPIZAÇÃO DA PAISAGEM

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos
Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás,
para a obtenção do grau de mestre(a), aprovada em 12 de Fevereiro de 2020, pela
Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Prof. Dr. Fabrício Barreto Teresa
Presidente da banca
Universidade Estadual de Goiás



Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
Universidade Federal de Goiás



Prof. Dra. Luciane Madureira de Almeida
Universidade Estadual de Goiás

Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel Carlos Dias Cotrim e Fleuza Camilo de Abreu. Aos meus amigos, que muito amo. A todos os professores que tive ao longo da vida. Também dedico a todas as pessoas que me ajudaram no decorrer do mestrado. Muito obrigado a todos.

AGRADECIMENTOS

Dedico meus sinceros agradecimentos a:

Profª Drª Luciana de Souza Ondeí e Prof. Dr. Fabrício Barreto Teresa, que proporcionaram todos os recursos para a execução deste trabalho. Agradeço pela orientação com grande paciência, dedicação e atenção, por sempre acreditarem no meu trabalho e na minha capacidade. Também agradeço pelas caronas nos dias em que eu não tinha condições de ir para a UEG.

Meus pais, Manoel Cotrim e Fleuza Camilo, por sempre me incentivarem a estudar e a ser alguém na vida. Agradeço pelo apoio, investimento e por nunca terem desacreditado dos meus sonhos.

A todos os meus professores ao longo da vida, que contribuíram para a minha formação, despertaram meu interesse pela profissão de professor e pelo amor à ciência e à pesquisa. Agradeço de forma especial à professora do ensino médio, Fernanda Figueiredo, de Biologia, que me fez gostar da disciplina devido ao amor que transmitia em suas aulas, sempre explicando o conteúdo da melhor forma possível. Também agradeço à Profª Drª Luciana Damacena Silva, minha professora de Fisiologia Humana e Comparada I e Parasitologia na graduação, que além de ser uma grande professora, tornou-se uma amiga e me ajudou bastante durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Danilo Grünig, por tirar minhas dúvidas sempre que necessário, sendo sempre muito receptivo.

Minhas amigas-irmãs, Kamila Souza e Hellen, por serem pessoas que amo muito, e pelas inúmeras lembranças boas da nossa adolescência, histórias e momentos que passamos juntas.

Ao meu amigo Wesley Falcão, pelas ajudas durante o mestrado, sempre me socorrendo quando necessário.

Minhas amigas de turma da graduação, Amanda Fernandes e Yasmim Reis, por todo o apoio prestado em todos os momentos.

Ao meu amigo Lucas Leonardo, pelas inúmeras ajudas em campo, no laboratório e em casa.

À minha amiga Izabel Cristina, por me ajudar quando decidi sair de casa e me mudar para Anápolis.

Aos estudantes de iniciação científica, Felipe Xavier, Suellem Santana, Leonardo, Vinícius Leite e Max Miller, pela ajuda no laboratório e em campo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biogeografia e Ecologia Aquática, que me ajudaram em algum momento na execução deste trabalho, especialmente tirando dúvidas de estatística.

Ao meu cachorro, Jon Snow, por me trazer alegria e me fazer companhia durante a escrita deste trabalho.

A todos os funcionários da Floresta Nacional de Silvânia (FLONA), pelas ajudas durante as etapas em campo e no período em que morei na FLONA.

Agradeço também pelo financiamento obtido por meio do convênio UEG/CAPES Nº 817164/2015 – CAPRES/PROAP, e ao CNPq, por meio da Chamada Universal 01/2016, Processo Nº 427452/2016-3.

À Universidade Estadual de Goiás (UEG), pelas oportunidades oferecidas aos estudantes, especialmente pela bolsa que recebi no meu primeiro ano de mestrado.

Ao CNPq, pela Bolsa de Apoio Técnico à Pesquisa – Nível Superior – 1A.

Por fim, agradeço a Deus e a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui e concluir mais essa etapa da minha vida.

Sempre se deve ter cuidado com livros – disse Tessa –, e com o que está dentro deles, pois as palavras têm o poder de nos transformar.

 *Anjo mecânico, Cassandra Clare*

RESUMO

O grau de antropização no uso da terra ao redor dos cursos d'água pode interferir na qualidade da água e trazer danos aos organismos aquáticos. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do uso e ocupação da terra e da qualidade da água sobre biomarcadores genéticos e bioquímicos de peixes. Para isso, lambaris da espécie *Astyanax lacustris* engaiolados foram expostos por 96 horas em 13 riachos inseridos em matrizes com diferentes graus de antropização durante a estação seca e chuvosa. Após a exposição, sangue, fígado e brânquias foram coletados para análises de múltiplos biomarcadores (micronúcleos, peroxidação lipídica, enzimas antioxidantes: glutatona peroxidase, catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase e enzima de biotransformação: glutatona S-transferase). Os resultados demonstraram que o gradiente de antropização da paisagem associou-se com os danos genotóxicos e estresse oxidativo nas estações seca e chuvosa. A qualidade da água foi negativamente associada com o grau de antropização da paisagem no período seco, indicando perda da qualidade da água com a conversão da paisagem nativa em paisagens antrópicas. Esses resultados indicam que as mudanças no uso do solo interferem em processos genéticos e bioquímico dos organismos. Desta forma, o uso de múltiplos biomarcadores pode representar uma estratégia eficaz para a avaliação e monitoramento da antropização da paisagem.

Palavras-chave: biomarcadores, ecotoxicologia, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, genotoxicidade, micronúcleo.

ABSTRACT

The degree of anthropization in land use around watercourses can interfere with water quality and cause damage to aquatic organisms. This study aimed to evaluate the influence of land use and occupation and water quality on fish genetic and biochemical biomarkers. For this purpose, the caged *Astyanax lacustris* licks were exposed for 96 hours in 13 streams inserted in matrices with different degrees of anthropization during a dry and rainy season. After exposure, blood, liver and gills were collected for analysis of multiple biomarkers (micronuclei, lipid peroxidation, antioxidant enzymes: glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and biotransformation enzymes: glutathione S-transferases). The results demonstrated that the gradient of anthropization of the landscape was associated with genotoxic damage and oxidative stress in the dry and rainy seasons. The quality of the water was negatively associated with the degree of anthropization of the landscape in the dry period, loss of water quality with conversion of the native landscape to anthropic landscapes. These results indicated that the, as changes in land use interfere with the genetic and biochemical processes of organisms. In this way, the use of multiple biomarkers can use an effective strategy to assess and monitor the anthropization of the landscape.

Keywords: antioxidant enzymes, biomarkers, ecotoxicology, genotoxicity, micronucleus, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Figura 1.1 – As defesas antioxidantes enzimáticas trabalham em conjunto para proteger as células contra espécies reativas de oxigênio. As abreviaturas SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH representam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase, respectivamente.20

ARTIGO

Figura 1.1 – Mapa da área de estudo no estado de Goiás (GO), Brasil. Os pontos pretos simbolizam os locais de exposição inseridos em matriz com diferentes graus de antropização na paisagem. Os círculos ao redor dos locais de exposição representam *buffers* de 200 e 800 m. A área de drenagem de cada local é mostrada com contorno preto. Essas delimitações foram utilizadas para caracterização do uso do solo para cada local de exposição.33

Figura 1.2 – Esquema representativo do delineamento do trabalho. As gaiolas com 13 indivíduos da espécie *Astyanax lacustris* foram expostas em locais com diferentes graus de antropização no uso e cobertura da terra. Os peixes ficaram expostos nos locais por 96 h. Após o tempo de exposição, os peixes foram eutanasiados e coletou-se sangue para análise de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (ANs) e fígado e brânquias para análise de enzimas antioxidantes (CAT = catalase, GPx = glutathione peroxidase, SOD = superóxido dismutase e GR = glutathione redutase) e enzima de biotransformação (GST = glutathione S-transferase).....34

Figura 1.3 – Regressão linear simples entre as atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e a Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) em fígado de *Astyanax lacustris* na estação seca, após 96 h de exposição em locais com diferentes pressões antropicas (Índice de Perturbação Antropogênica – IPA), destacando a linha que representa o modelo de regressão com os respectivos valores de p e R².....47

Figura 1.4 – Regressão linear simples entre as atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e a Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) em fígado de *Astyanax lacustris* na estação seca, após 96 h de exposição em locais com diferentes pressões antropicas (Índice de Perturbação Antropogênica – IPA), destacando a linha que representa o modelo de regressão com os respectivos valores de p e R².48

Figura 1.5 – Relação entre o Índice de Perturbação Antropogênica (IPA) e a frequência de anormalidades nucleares para a estação seca (**a**) e estação chuvosa (**b**), destacando a linha que representa o modelo de regressão com os respectivos valores de p e R².48

Figura 1.6 – Micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *Astyanax lacustris* expostos por 96 h em áreas com diferentes graus de impacto antrópico: **a**) célula normal. **b**) célula micronucleada – o micronúcleo é uma estrutura circular visível no citoplasma e é semelhante ao núcleo principal, porém com tamanho inferior. **c**) célula com núcleo *notched* – a membrana nuclear apresenta uma invaginação profunda, como um entalhe. **d**) célula com núcleo *lobed* - o núcleo apresenta invaginação convexa e bem definida (lobulo). **e**) célula com núcleo *broken-eggs* – o núcleo apresenta broto, há a formação de um corpo arredondado que continua ligado ao núcleo através de um filamento de cromatina. **f**) célula com núcleo *blebbed* – a membrana nuclear apresenta formato irregular. **g**) célula binucleada – apresenta dois

núcleos. **h)** célula com núcleo vacuolated – o núcleo apresenta um buraco desprovido de material genético. Ampliação 1000 ×. Barras pretas na horizontas = 5 μm.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela A.1 – Porcentagem de uso de solo ao nível de bacia hidrográfica e buffer nos locais amostrais e Índice de Perturbação Antropogênica (IPA) (%).	63
Tabela B.1 – Variáveis limnológicas dos locais de amostragem em comparação com a Resolução nº 357 do CONAMA e valores de IQA.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido diclorofenóxiacético	IC	Inhibitory Concentration
ANs	Anormalidades nucleares	INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ATP	Adenosina trifosfato	IPA	Índice de Perturbação Antropogênica
BSA	Albumina de Soro Bovino	IQA	Índice de Qualidade da Água
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	LP	Peroxidação lipídica
CAT	Catalase	LPO	Lipoperoxidação
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo	m	Massa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais	MDA	Malondialdeído
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	MDE	Modelo Digital de Elevação
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente	MNs	Micronúcleos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxigênio	OD % sat	Oxigênio dissolvido saturado
DTT	Ditiotreitól	PMSF	Fenilmetilsulfonil Fluoreto
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético	PROAP	Programa de Apoio à Pós-Graduação
EROs	Espécies reativas de oxigênio	ROOH.	Peróxidos lipídicos
FLONA	Floresta Nacional de Silvânia	SOD	Superóxido dismutase
GPx	Glutationa peroxidase	TBA	Ácido tiobarbitúrico
GR	Glutationa redutase	TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
GSH	Glutationa reduzida	tBOOH	Terc-butil-hidroperóxido
GSSG	Glutationa dissulfeto	TEP	1,1,3,3-tetrahidroxipropano
GST	Glutationa S-transferase	UEG	Universidade Estadual de Goiás
IBR	Integrated Biomarker Response	v	Volume
		WST	Water-Soluble Tetrazolium

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

Cd. Cádmio

Cr. Cromo

Cu. Cobre

Fe. Ferro

H₂O₂. Peróxido de hidrogênio

HCl. Ácido clorídrico

KCl. Cloreto de potássio

Mn. Manganês

O₂^{•-}. Radicais superóxido

OH[•]. Hidroxil

Pb. Chumbo

Zn. Zinco

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	16
1.1.	<i>Biomonitoramento e biomarcadores no contexto do monitoramento ambiental.....</i>	<i>16</i>
1.2.	<i>Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo.....</i>	<i>18</i>
1.3.	<i>Biomarcadores citogenéticos.....</i>	<i>21</i>
2.	OBJETIVO	23
	REFERENCIAS.....	23
	ARTIGO 1. EFEITO DA ANTROPIZAÇÃO DA PAISAGEM SOBRE ORGANISMOS AQUÁTICOS: RESPOSTAS CITOGENÉTICAS E BIOQUÍMICAS EM PEIXES.....	30
1.1.	INTRODUÇÃO	30
1.2.	MATERIAL E MÉTODOS	32
	<i>Área de estudo.....</i>	<i>32</i>
	<i>Aspectos éticos</i>	<i>33</i>
	<i>Organismo teste e procedimentos experimentais.....</i>	<i>33</i>
	<i>Caracterização ambiental.....</i>	<i>35</i>
	<i>Obtenção do gradiente de antropização da paisagem.....</i>	<i>36</i>
	<i>Biomarcadores</i>	<i>38</i>
	<i>Biomarcadores citogenéticos.....</i>	<i>44</i>
	<i>Resposta integrada de biomarcadores (IBR).....</i>	<i>46</i>
	<i>Análises estatísticas.....</i>	<i>46</i>
1.3.	RESULTADOS.....	46
	<i>Caracterização ambiental.....</i>	<i>46</i>
	<i>Marcadores bioquímicos vs antropização da paisagem.....</i>	<i>47</i>
	<i>Biomarcadores citogenéticos vs antropização da paisagem</i>	<i>48</i>
1.4.	DISCUSSÃO	49
1.5.	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS.....	53
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	APÊNDICE A. RESULTADO ANÁLISE DO USO E COBERTURA DA TERRA.....	63
	APÊNDICE B. RESULTADO ANÁLISE DO USO E COBERTURA DA TERRA.....	64
	ANEXO A. PESOS ATRIBUÍDO A CADA PARÂMETRO DE CÁLCULO DO IQA .	65
	ANEXO B. EQUAÇÕES REPRESENTATIVAS DAS CURVAS DE QUALIDADE PARA AS VARIÁVEIS PROPOSTAS.....	66
	ANEXO C.PARECER CONSUBSTANCIAL DO PROJETO DE PESQUISA PROTOCOLO N°. 006/2018.....	67

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A crescente poluição e degradação dos ambientes aquáticos tem acarretado vários impactos para a saúde dos peixes e demais organismos que vivem nesses ambientes (VIANA *et al.*, 2018a). Muitos estressores, como poluentes liberados nos ambientes aquáticos, ou as alterações nas condições químicas e físicas decorrentes da degradação ambiental podem prejudicar a sobrevivência e fisiologia dos organismos (JOVANOVIĆ *et al.*, 2018). Logo, a avaliação de respostas biológicas (biomarcadores) obtidas a partir desses organismos podem sinalizar a ocorrência dos estressores, motivo pelo qual os biomarcadores podem ser úteis no contexto do monitoramento ambiental (VIANA *et al.*, 2018a).

A antropização da paisagem é um dos grandes responsáveis pela degradação dos ambientes aquáticos continentais, especialmente riachos (LEAL *et al.*, 2016). A supressão da vegetação nativa por atividades antropogênicas, como a mudança da cobertura do solo para agropecuária, contribui para o aumento do aporte de sedimentos e substâncias tóxicas para dentro dos riachos (VIANA *et al.*, 2018a). Nesse contexto, analisar as respostas biológicas dos organismos aquáticos às mudanças no uso e ocupação da terra pode proporcionar informações úteis para o uso de bioindicadores/biomarcadores para a avaliação de impacto ambiental na paisagem.

1.1. Biomonitoramento e biomarcadores no contexto do monitoramento ambiental

O biomonitoramento consiste em utilizar organismos para averiguar a qualidade de determinado ambiente, levando em conta a ação de estressores sobre esses. Os estressores vão acarretar mudanças nos organismos que passarão a apresentar alterações em vários níveis da organização biológica, que vai desde a organização celular, bioquímica, fisiológica, genética, histológica, que acabam por refletir nos padrões comportamentais interferindo assim na estrutura populacional da espécie (LIMA *et al.*, 2018). Desta forma, podemos coletar informações obtidas de níveis inferiores da organização biológica e informações de níveis elevados (biomarcadores ou bioindicadores). Bioindicadores podem ser organismos (espécie) ou comunidades que refletem as condições ambientais do local onde se encontram (KAPUSTA, 2008). A presença, abundância e condições destes organismos ou comunidades fornecem indicativos de uma determinada condição ambiental (MARQUES; MARANGONI; BIANCHINI, 2016).

No Brasil, parâmetros abióticos (físico-químicos) e microbiológicos são utilizados para avaliação da qualidade da água, tendo como base os limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução CONAMA 357/2005. Contudo, só as

análises físico-químicas não fornecem dados eficientes sobre o verdadeiro estado de saúde ambiental, por não apresentarem dados sobre efeitos biológicos e demonstrarem, somente, a presença ou ausência dos poluentes (SILVA *et al.*, 2018). Dessa forma, esses parâmetros geram uma informação parcial sobre a qualidade do ambiente.

O uso de bioindicadores e biomarcadores pode ser uma estratégia útil para complementar ou até mesmo substituir as informações obtidas por parâmetros físico-químicos. O biomonitoramento leva em conta a resposta do organismo ao meio onde está inserido, por responder aos distúrbios, sintetizando assim uma história recente das condições ambientais. Por exemplo, a biota aquática está sujeita a um grande número de estressores que acabam prejudicando sua capacidade de homeostase (ARIAS *et al.*, 2007) levando os organismos a apresentarem distúrbios bioquímicos, como o estresse oxidativo, e danos ao material genético (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Os organismos estão estruturados em diferentes níveis de organização biológica, susceptíveis a sofrerem efeitos das condições ambientais. Entretanto, os níveis moleculares e bioquímico são os primeiros a sofrerem alterações decorrentes de estressores, provocando assim alterações fisiológicas que afetam funções vitais (crescimento, reprodução, doenças ou morte) (MARQUES; MARANGONI; BIANCHINI, 2016). Essas alterações nos níveis mais baixos da organização biológica podem refletir nos níveis mais elevados (KAPUSTA, 2008), influenciando o tamanho das populações e as comunidades a qual a espécie faz parte e, conseqüentemente, levando o desequilíbrio de todo o ecossistema envolvido (MARQUES; MARANGONI; BIANCHINI, 2016). Por isso, biomarcadores moleculares, bioquímicos, e celulares são excelentes para avaliação e monitoramento por fornecerem respostas mais rápidas aos estressores (KAPUSTA, 2008).

Os biomarcadores podem ser classificados como sendo de exposição, em que se quantifica a substância exógena em um compartimento do organismo; de efeito, o qual é caracterizado por alterações bioquímicas, fisiológicas, em tecidos e fluidos corporais devido a interação de receptores biológicos com substâncias exógenas; e de susceptibilidade, caracterizados pela capacidade própria ou adquirida do organismo de enfrentar a exposição a uma substância xenobiótica (AMORIM, 2003). Dentre os biomarcadores podemos citar as enzimas de biotransformação, parâmetros de estresse oxidativo, produtos da biotransformação, proteínas de estresse, metalotioneínas, parâmetros genotóxicos, hematológicos, imunológicos, endócrinos, reprodutivos, fisiológicos, histológicos e morfológicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Muitos estudos têm utilizado biomarcadores para avaliar as conseqüências biológicas de estressores (JESUS; CARVALHO, 2008; OLIVEIRA; SOUZA,

2006) por serem sensíveis às mudanças ambientais, sejam elas antropogênicas ou naturais (SANTOS *et al.*, 2019).

Muitos organismos podem ser utilizados para o biomonitoramento aquático. Os peixes podem ser ótimos candidatos por serem sensíveis a compostos antropogênicos (SPOSITO *et al.*, 2019). Os peixes respondem bem às condições estressantes, regulando o metabolismo celular e ativando vários mecanismos de defesa (VIANA *et al.*, 2018a). Eles ocupam diferentes posições na cadeia trófica (LIMA *et al.*, 2018), são um grupo bastante diversificado e estão sob intensa exposição a compostos xenobióticos no meio aquático (DISNER *et al.*, 2017) e são fáceis de serem capturados e identificados (FREITAS; SIQUEIRA-SOUZA, 2009).

1.2. Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes. Quando a formação endógena de EROs sobressai a capacidade das defesas antioxidantes pode ocorrer danos as macromoléculas celulares como lipídios, DNA e proteína (SIES, 1985). A biotransformação é o processo metabólico pelo qual ocorre a neutralização de compostos que possam interagir com a célula e, conseqüentemente, causar danos ao organismo, por isso é um processo natural. Esse metabolismo de detoxificação é realizado por diferentes enzimas que metabolizam esses compostos para serem secretados. O processo de biotransformação é dividido em três fases. A fase I tem como característica as reações de redução, oxidação e hidrólise. Na fase II ocorre a conjugação dos compostos e por fim na fase III ocorre a excreção (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Um organismo apresenta vários sistemas enzimáticos envolvidos na biotransformação, porém estes sistemas apresentam em comum as enzimas monooxigenases (citocromo P450), hemeproteínas e flavoproteínas responsáveis pelas reações iniciais (fase I) de desintoxicação e excreção. Para isso, metabolizam compostos lipofílicos e hidrofílicos através de reações de oxidação, redução ou hidrólise, facilitando assim a excreção destes metabólicos (STEGEMAN; HAHN, 1994; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre as enzimas envolvidas na fase II destaca-se a glutathione *S*-transferase (GST) que catalisa as reações de conjugação de xenobióticos com a glutathione reduzida (GSH). Nesta fase, compostos lipofílicos são conjugados em compostos hidrofílicos facilitando assim a eliminação pela célula por serem altamente solúveis em água. Estas enzimas podem servir como biomarcadores de efeito ou exposição por metabolizarem vários xenobióticos e possuem papel

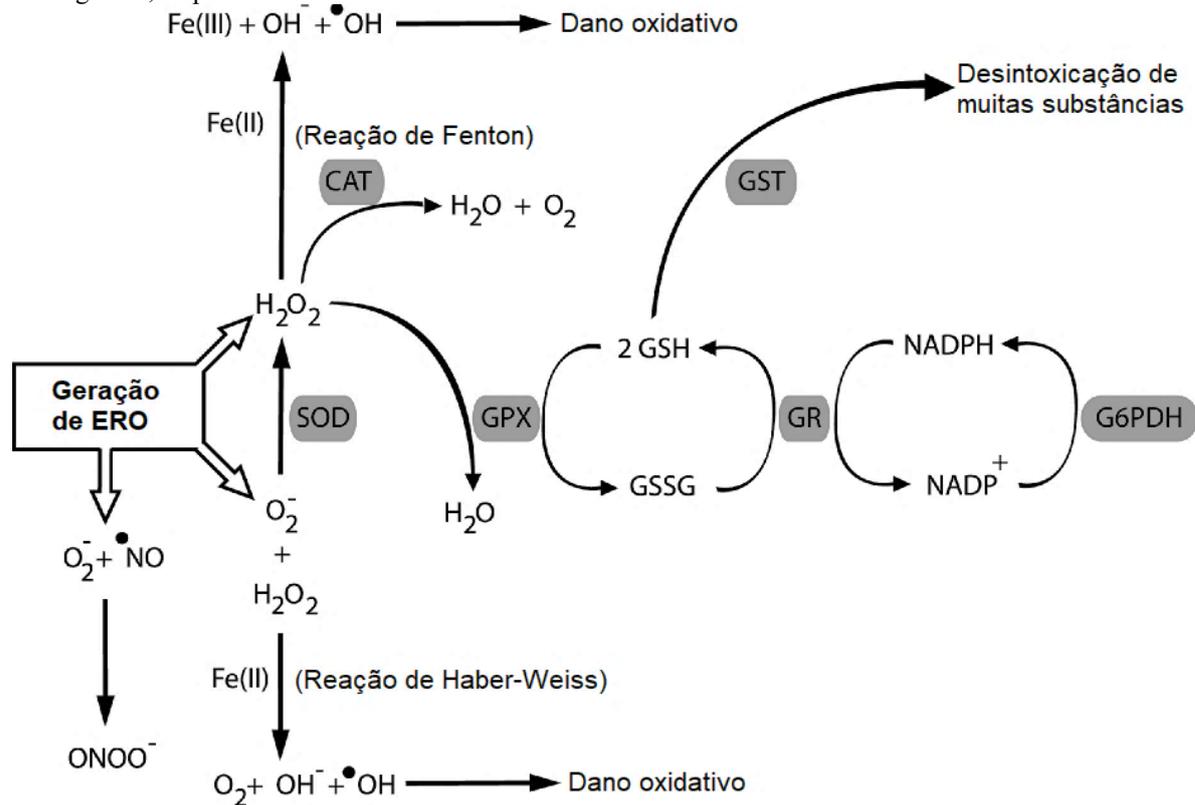
importante no sistema antioxidante por prevenir a peroxidação lipídica (KIM *et al.*, 2010; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Entretanto, durante o processo de biotransformação, pode ocorrer a formação de EROs. EROs são altamente citotóxicas uma vez que os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxil (OH^{\cdot}) reagem oxidando várias macromoléculas celulares. O H_2O_2 não é um radical livre, entretanto possui grande potencial reativo e deletério, devido participar da geração de $O_2^{\cdot-}$. Outro fator é que o H_2O_2 tem vida longa, pode atravessar a membrana plasmática e seu potencial tóxico pode ser aumentado dez mil vezes caso haja ferro no organismo em concentrações elevadas (BARBOSA *et al.*, 2010).

As EROs também podem ser produzidas pelo organismo de forma natural devido ao metabolismo do oxigênio nas mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de elétrons. A produção de radicais livres, em quantidades adequadas, atua como mediadoras na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas como geração de ATP, ativação de genes, fertilização do óvulo. Entretanto, quando há uma produção em excesso de EROs, o sistema antioxidante pode não ser capaz de combater todas as espécies reativas geradas pela biotransformação e pelo próprio metabolismo, resultando em estresse oxidativo. O sistema de defesa antioxidante possui a função de inibir ou reduzir os danos causados pelos radicais livres ou das espécies reativas não radicais e pode ser dividido em enzimático e não enzimático, constituído por uma variedade de substâncias endógenas ou de origem alimentar (BARBOSA *et al.*, 2010).

Assim, enzimas antioxidantes são fundamentais para manter íntegro o metabolismo celular quando um organismo se encontra em condições em que há produção de EROs (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A superóxido dismutase (SOD) tem função de realizar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ que leva a produção de H_2O_2 . As enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) degradam o H_2O_2 . Caso ocorra acúmulo de H_2O_2 haverá a geração de OH^{\cdot} (por meio das reações de Fenton e HaberWeiss) que pode levar a danos oxidativos por não existir defesa enzimática contra esse radical. Durante a degradação do H_2O_2 , a GPx utiliza a GSH como cofator. Após a reação, a GSH se torna oxidada (glutaciona dissulfeto - GSSG) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Para que a GPx possa continuar usando a GSH como cofator, a GSSG precisar ser reciclada, ou seja, reduzida novamente a GSH, essa reação é catalisada pela glutaciona redutase (GR) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008) (Figura 1).

Figura 1.1 – As defesas antioxidantes enzimáticas trabalham em conjunto para proteger as células contra espécies reativas de oxigênio. As abreviaturas SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH representam as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona S-transferase, glutatona redutase, glutatona peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase, respectivamente.



Fonte: HERMES-LIMA 2005.

A reatividade alta das EROs com macromoléculas, acarreta a inativação de enzimas, peroxidação lipídica (LP), danos ao DNA e morte celular (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), sendo então potencialmente tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (NORDBERG; ARNÉR, 2001). A LP, também chamada de lipoperoxidação (LPO), trata-se da perda da integridade das biomembranas celulares devido à perda da permeabilidade, fluidez e ruptura decorrente da produção excessiva de EROs (GIROTTI, 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Além dos danos à membrana celular, pode haver danos à molécula de DNA decorrentes da decomposição de hidroperóxidos em misturas complexas que provocam adutos com o DNA (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A LP ocorre devido a ligação de grupos hidroperóxidos a sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, conseqüentemente há alteração da membrana e lipoproteínas e liberação de radicais livres que podem provocar mais danos à membrana (GIROTTI, 2002).

Entre os marcadores mais utilizados para se detectar LP destaca-se o malondialdeído (MDA) que é um subproduto da LP. O MDA produzido pela peroxidação lipídica pode estar covalentemente ligado com várias moléculas (DRAPER; MCGIRR; HADLEY, 1986). Em peixes é possível obter dados a respeito da biotransformação e ação do sistema antioxidante em

tecidos como brânquias, por apresentarem uma área de contato direto e maior com os agentes xenobióticos (CASTRO *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2019) e fígado e rim, por serem os principais órgãos responsáveis pela desintoxicação onde a biotransformação ocorre (LINS *et al.*, 2010). A contaminação do peixe pelo composto xenobiótico ocorre através da superfície das brânquias que absorvem as substâncias diluídas na água ou através da alimentação (KENNEDY; FARRELL, 2005). Os compostos xenobióticos absorvidos pelas brânquias são transportados pela corrente sanguínea até órgãos responsáveis por armazenamento ou metabolização para futura eliminação. O fígado é o principal órgão envolvido no processo de biotransformação e eliminação de xenobióticos e, por isso, pode ser usado para análises de biomonitoramento (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.3. Biomarcadores citogenéticos

Biomarcadores citogenéticos são parâmetros utilizados como marcadores biológicos de alterações no material genético devido a exposição a compostos que possam levar a mutações genéticas, danos cromossômicos ou lesões no DNA. Para isso são utilizados ensaios de avaliação de genotoxicidade, como é o caso do teste de micronúcleo (MN) (VALENTE *et al.*, 2017).

Micronúcleos (MNs) são corpúsculos de cromatina extranuclear envoltos por membrana nuclear com dimensão inferior ao do núcleo principal (HINTZSCHE *et al.*, 2017). O aparecimento de MNs em células é normal e natural, porém, em menor frequência. Quando há uma exposição a compostos genotóxicos, ocorre um aumento na frequência de MNs após os ciclos de divisão celular (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). Diante disso, os MNs são decorrentes de contaminantes clastogênicos ou aneugênicos que atuam nas células parentais (FENECH, 2000) e durante a mitose e meiose, fragmentos cromossômicos resultantes de quebras (ou cromossomos inteiros) não são incorporados no núcleo principal das células filhas (RIBEIRO, 2003). O aumento da frequência pode ser maior em células tumorais, células com defeito no sistema de reparo e células que interromperam o sistema de *checkpoint* do ciclo celular (TERRADAS *et al.*, 2010).

Após a formação dos MNs não está bem definido na literatura qual é o destino deles. No entanto, foram sugeridas seis possibilidades para o destino dos MNs e possíveis consequências, sendo elas a degradação, reincorporação, extrusão, persistência, condensação prematura de cromossomos/cromotripsia e a eliminação de células micronucleadas por apoptose. A degradação do MN ocorre no citoplasma, entretanto se houver apenas inativação ou perda do DNA micronuclear, e a célula sobreviver, essa célula micronucleada pode dar

origem a um tumor. Contudo, se o metabolismo celular não for alterado e a célula conseguir usufruir do DNA contido no MN e este não tenha sido alterado, ou ocorra a reincorporação no núcleo principal durante o próximo evento de divisão celular, podem surgir células filhas normais não mutadas. Eventos de cromotripsia ou chromoanagenesis podem fazer com que haja o surgimento de cromossomos hipermutados. Caso a célula micronucleada não tenha metabolismo e conseqüentemente não realize divisão celular, ela não traz risco para o organismo (HINTZSCHE *et al.*, 2017).

Além do destino dos MNs ser controverso na literatura, a biologia básica e os impactos na célula também são. Há relatos que o material genético contido nos MNs é perdido, dessa forma não possui atividade transcricional. Outros sugerem que o material genético dos MNs é ativamente transcrito e expresso. Um trabalho de revisão de 2010 reuniu dados sobre replicação, transcrição e reparo da cromatina nos MNs. Os autores constataram que o material genético nos MNs pode ser replicado, expresso e reparado. Porém para isso ocorrer vai depender do próprio conteúdo genético específico para cada micronúcleo, bem como a funcionalidade da membrana nuclear e complexo de poros nucleares. Esses fatores também contribuem para o destino dos MNs (TERRADAS *et al.*, 2010). Dessa forma a aparição de MNs podem levar a mutações no cromossomo ou genoma e são frequentemente usados em testes de genotoxicidade (HINTZSCHE *et al.*, 2017) a fim de se identificar potenciais agentes genotóxicos (TERRADAS *et al.*, 2010).

A frequência de MNs é utilizada para detectar de forma rápida e confiável danos causados por agentes clastogênicos ou aneugênicos em ensaios *in vivo* e *in vitro* na área da genética toxicológica (FENECH, 2000). Por ser uma técnica sensível, simples e de baixo custo a análise de MNs é eficiente e adequada para monitorar ambientes aquáticos (MACEDA *et al.*, 2015) uma vez que MNs são formados devido a ação de compostos genotóxicos que causam danos cromossômicos e citocinéticos (ARAÚJO *et al.*, 2018). MNs são visíveis nos citoplasmas de células interfásicas e são semelhantes ao núcleo por serem revestidos de membrana nuclear e tendo tamanho variado (BENITES *et al.*, 2014). Para a estrutura ser considerada um MN ela deve ter a mesma refrigência do núcleo, ser circular ou ovoide, não está ligada ao núcleo, com cor e estrutura semelhante ao núcleo e ter diâmetro $1/3 - 1/20$ do núcleo principal (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Além de MNs, tem se ainda a presença de anormalidades nucleares (ANs) em células de peixes expostos a substâncias genotóxicas e tais anormalidades são também indicadores de danos genotóxicos. As ANs foram descritas por Carrasco, Tilbury e Myers em 1990 como sendo núcleo *notched*, *lobed*, *blebbed* e *vacuolated*. Em 1992 Tolbert, Shy e Allen descreveram outras

duas anormalidades como sendo binucleação e núcleo *broken-eggs*. Essas anormalidades podem ser usadas para complementar a análise de MN por alguns considerar como sendo respostas primárias antes da formação do MN (THOMÉ; SILVA; SANTOS, 2016). Essas ANs são decorrentes de lesões provocadas por compostos genotóxicos que induzem erros durante a mitose ou meiose fazendo com que o material genético fique atrasado, alterando assim o formato do núcleo (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001; BOMBAIL *et al.*, 2001; FENECH, 2000). O teste de MN e ANs é uma importante ferramenta de biomonitoramento utilizada em pesquisas básicas e de impacto ambiental de larga escala (OLIVEIRA; MORAIS; GRASSI, 2018).

2. OBJETIVO

Avaliar a influência da antropização da paisagem sobre os biomarcadores genéticos e bioquímicos de uma espécie de peixe bioindicadora (*Astyanax lacustris*) e testar se os efeitos são consistentes ao longo das estações.

REFERENCIAS

ABORGIBA, M.; KOSTIĆ, J.; KOLAREVIĆ, S.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; ELBAHI, S.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J.; LENHARDT, M.; PAUNOVIĆ, M.; GAČIĆ, Z.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. Flooding modifies the genotoxic effects of pollution on a worm, a mussel and two fish species from the Sava River. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 358–367, 2016.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 158–170, 2003.

ARAÚJO, F. G.; MORADO, C. N.; PARENTE, T. T. E.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; GOMES, I. D. Biomarkers and bioindicators of the environmental condition using a fish species (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803) in a tropical reservoir in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 351–359, 2018.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. De; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and Other Nuclear Lesions as Genotoxicity Indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 3, p. 221–225, 2001.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. De C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BENITES, L. M.; DONCATO, K. B.; MINHO, T. D. S.; PERAZZO, G. X. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 107–113, 2014.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383–392, 2001.

BRASIL. **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Brasília.

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. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990.

CASTRO, J. S.; FRANÇA, C. L.; FERNANDES, J. F. F.; SILVA, J. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; TEIXEIRA, E. G. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 410–418, 2018.

DALZUCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; SIMÕES, L. A. R.; DE SOUZA, M. S.; PETRY, I. E.; ANDRIGUETTI, N. B.; SILVA, G. J. H.; DA SILVA, L. B.; GEHLEN, G. In situ monitoring of the Sinos River, southern Brazil: water quality parameters, biomarkers, and metal bioaccumulation in fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 10, p. 9485–9500, 2018.

DISNER, G. R.; CALADO, S. L. M.; SILVA ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. Toxicity of naphthalene in the Neotropical Fish *Astyanax Lacustris* (Characiformes: Characidae) and *Geophagus Brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae). **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, v. 17, n. 1, p. 7, 2017.

DRAPER, H. H.; MCGIRR, L. G.; HADLEY, M. The metabolism of malondialdehyde. **Lipids**, v. 21, n. 4, p. 305–307, 1986.

FARKAS, A.; ÁCS, A.; VEHOVSZKY, Á.; FALFUSYNSKA, H.; STOLIAR, O.; SPECZIÁR, A.; GYŐRI, J. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. **Science of The Total Environment**, v. 599–600, p. 760–770, 2017.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FONSECA, A. R.; SANCHES FERNANDES, L. F.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, S. M.; PACHECO, F. A. L. From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. **Science of The Total Environment**, v. 550, p. 972–986, 2016.

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. S. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 135, p. 39–45, 2009.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; GUILOSKI, I. C.; De LIMA, S. B.; SILVA DE ASSIS, H. C.; LONGHI, S. J.; PRIOLI, A. J. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1208–1218, 2017.

GIROTTI, A. W. Introduction to serial reviews on regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism¹. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 153, 2002.

GOMES, J. B.; PEREIRA, N. J.; SOUSA, E. L. De; SOUSA, D. Da S.; LENZ, T. De M.; SANTOS, D. M. S. Evaluation of aquatic contamination in an urban lagoon environment in a coastal region in the north of Brazil. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 2, p. 920–932, 2019.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: REGULATION AND ADAPTATION**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 319–368.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTHS, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate

of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85–98, 2017.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. De. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Australis**, v. 12, n. 04, p. 680–693, 2008.

JOVANOVIĆ, J.; KOLAREVIĆ, S.; MILOŠKOVIĆ, A.; RADOJKOVIĆ, N.; SIMIĆ, V.; DOJČINOVIĆ, B.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; PAUNOVIĆ, M.; KOSTIĆ, J.; SUNJOG, K.; TIMILJIĆ, J.; DJORDJEVIĆ, J.; GAČIĆ, Z.; ŽEGURA, B.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin *in vitro* and *in situ*. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 1289–1299, 2018.

KAPUSTA, S. C. **Bioindicação ambiental**. Porto Alegre: Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 88 p. 2008.

KENNEDY, C. J.; FARRELL, A. P. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile *Pacific herring*, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 323, n. 1, p. 43–56, 2005.

KIM, J. H.; DAHMS, H. U.; RHEE, J. S.; LEE, Y. M.; LEE, J.; HAN, K. N.; LEE, J. S. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 151, n. 1, p. 99–106, 2010.

KOSTIĆ, J.; KOLAREVIĆ, S.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; ABORGIBA, M.; GAČIĆ, Z.; PAUNOVIĆ, M.; VIŠNJIĆ-JEFTIĆ, Ž.; RAŠKOVIĆ, B.; POLEKSIĆ, V.; LENHARDT, M.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 1670–1681, 2017.

LI, S.; VILLENEUVE, D. L.; BERNINGER, J. P.; BLACKWELL, B. R.; CAVALLIN, J. E.; HUGHES, M. N.; JENSEN, K. M.; JORGENSEN, Z.; KAHL, M. D.; SCHROEDER, A. L.;

STEVENS, K. E.; THOMAS, L. M.; WEBERG, M. A.; ANKLEY, G. T. An integrated approach for identifying priority contaminant in the Great Lakes Basin – Investigations in the Lower Green Bay/Fox River and Milwaukee Estuary areas of concern. **Science of The Total Environment**, v. 579, p. 825–837, 2017.

LIMA, L. B. D. De; MORAIS, P. B. De; ANDRADE, R. L. T. De; MATTOS, L. V.; MORON, S. E. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 611–624, 2018.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. Da S. CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469–484, 2010.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, MS, Brasil. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 117–129, 2015.

MARQUES, J. A.; MARANGONI, L. F. B.; BIANCHINI, A. Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral. In: ZILBERBERG, C. *et al.* (Eds.). **Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, p. 221–232. 2016.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OLIVEIRA, F. A. De; MORAIS, T. P. De; GRASSI, L. E. A. Avaliação dos efeitos genotóxicos e contagem diferencial da série branca em indivíduos de *Astyanax bimaculatus* (Pices: Characidae) expostos a diferentes condições ambientais. **Ambiência**, v. 14, n. 3, p. 614–631, 2018.

OLIVEIRA, M. C. De; SOUZA, V. H. E. De. Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental. **Revista Uningá**, n. 10, p. 167–175, 2006.

PEREIRA, R. S. Poluição Hídrica: Causas e Consequencias. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20–36, 2004.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, R. L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173–200.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagenese Ambiental**. Canoas: ULBRA, p. 201–220. 2003.

SANTOS, C. C. M.; COSTA, J. F. M.; SANTOS, C. R. M.; AMADO, L. L. Influence of seasonality on the natural modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucididae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 227, p. 146-153, 2019.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. (Ed.). . **Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985. p. 1–8.

SILVA, F. D.; SILVA, C. L. Da; PORTES, R. G. Dos R.; HOFFMAN, E.; OLIVEIRA, R. da S.; MARTINS, M.; SILVA, C. O. Da; SILVA, F. C. Da. Avaliação ecotoxicológica da água do igarapé ouro preto utilizando a espécie bioindicadora *Leptodactylus petersii*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 2, p. 69–87, 2018.

SPOSITO, J. C. V.; FRANCISCO, L. F. V.; Do AMARAL CRISPIM, B.; Da SILVA DANTAS, F. G.; DE SOUZA, J. P.; VIANA, L. F.; SOLÓRZANO, J. C. J.; DE OLIVEIRA, K. M. P.; BARUFATTI, A. Influence of Land Use and Cover on Toxicogenetic Potential of Surface Water from Central-West Brazilian Rivers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 483–495, 2019.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS, D. C. (Ed.). **Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 206.

TERESA, F. B.; CASATTI, L. Importância da vegetação ripária em região intensamente desmatada no sudeste do Brasil: um estudo com peixes de riacho. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 5, n. 3, p. 444–453, 2010.

TERRADAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. Genetic activities in

micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60–67, 2010.

THOMÉ, R. G.; SILVA, P. M.; SANTOS, H. B. Avaliação de genotoxicidade da água de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de *Danio rerio*. **Conexão Ciência (Online)**, v. 11, n. 2, p. 9–16, 2016.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 271, n. 1, p. 69–77, 1992.

VALENTE, D.; COSTA-AMARAL, I. C.; CARVALHO, L. V. B. De; SANTOS, M. V. C. Dos; CASTRO, V. S. De; RODRIGUES, D. del R. F.; FALCO, A. De; SILVA, C. B.; NOGUEIRA, S. M.; GONÇALVES, E. S.; MOREIRA, J. C.; ANDRÉ, L. C.; TEIXEIRA, L. R.; SARCINELLI, P. de N.; SISENANDO, H. A.; OLIVEIRA, M. S. De; PERINI, J. A.; MATTOS, R. de C. O. da C.; LARENTIS, A. L. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. suppl 1, p. 1–21, 2017.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; CRISPIM, B. Do A.; CAVALCANTE, D. N. De C.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. The Response of Neotropical Fish Species (Brazil) on the Water Pollution: Metal Bioaccumulation and Genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 3, p. 476–485, 2018a.

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; SOLÓRZANO, J. C. J.; CRISPIM, B. do A.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris* in Response to Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 2, p. 327–334, 2018b.

VOGEL, H. F.; ZAWADZKI, C. H.; METRI, R. Florestas ripárias: importância e principais ameaças. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 4, n. 1, p. 24–30, 2009

ARTIGO 1. EFEITO DA ANTROPIZAÇÃO DA PAISAGEM SOBRE ORGANISMOS AQUÁTICOS: RESPOSTAS CITOGENÉTICAS E BIOQUÍMICAS EM PEIXES

Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹, Luciana de Souza Ondei¹, Eduardo Alves Almeida² & Fabrício Barreto Teresa¹

¹Laboratório de Biogeografia e Ecologia Aquática, Universidade Estadual de Goiás - Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo, BR 153, n. 3105, Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis, Goiás, CEP: 75132-903, Brasil.

²Departamento de Ciências Naturais, Fundação Universidade Regional de Blumenau, FURB, Blumenau, Santa Catarina, Brasil

Resumo – O grau de antropização no uso da terra ao redor dos cursos d’água podem interferir na qualidade da água e trazer danos aos organismos aquáticos. Neste estudo, avaliamos a influência do uso e ocupação da terra sobre biomarcadores citogenéticos e bioquímicos de peixes em riachos. Também avaliamos se as respostas dos biomarcadores são consistentes sazonalmente. Para isso, lambaris da espécie *Astyanax lacustris* engaiolados foram expostos por 96 h em 13 riachos inseridos em matrizes com diferentes graus de antropização durante a estação seca e chuvosa. Após a exposição, sangue, fígado e brânquias foram coletados para análises de múltiplos biomarcadores (micronúcleos, anormalidades nucleares, peroxidação lipídica, enzimas antioxidantes: glutathione peroxidase, catalase, superóxido dismutase, glutathione reductase e enzima de biotransformação: glutathione S-transferase). Os resultados demonstraram que o gradiente de antropização da paisagem associou-se positivamente com os danos genotóxicos e negativamente com as enzimas antioxidantes e de biotransformação em ambas as estações. O grau de antropização da paisagem também foi negativamente associado com a qualidade da água na estação chuvosa. Esses resultados indicam que as mudanças no uso do solo interferem em processos genéticos e bioquímico dos organismos. Desta forma, o uso de múltiplos biomarcadores pode representar uma estratégia eficaz para a avaliação e monitoramento da antropização da paisagem.

Palavras-chave: biomarcadores, ecotoxicologia, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, genotoxicidade, micronúcleo.

1.1. INTRODUÇÃO

A alteração da paisagem devido ao avanço de diferentes atividades antrópicas, como agricultura, pecuária e urbanização leva à degradação dos corpos d’água (LEAL *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2018). Essa degradação envolve a perda da cobertura vegetal natural nas margens dos corpos d’água, resultando em aumento do aporte de sedimento e substâncias

tóxicas e alteração da integridade química e física dos ambientes aquáticos (NAIMAN e DÉCAMPS, 1997; VIANA *et al.*, 2018a). A perda da vegetação natural, principalmente a ripária, além de alterar os riachos, pode modificar a dinâmica de vida dos organismos aquáticos. Isso acontece porque a vegetação ripária controla a produtividade primária, a temperatura e fornecimento de material alóctone para dentro do canal que servirá de abrigo, alimento e sítio reprodutivo para as espécies (TERESA e CASATTI, 2010). Além disso, a perda da vegetação pode aumentar o aporte de resíduos, provocar assoreamento e contaminação da água, levando à perda da diversidade (VIANA *et al.*, 2018b), visto que os ambientes aquáticos são receptores naturais da paisagem (ALLAN e CASTILLO, 2007).

A avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos é usualmente realizada com base em parâmetros físico-químicos e microbiológicos (SPOSITO *et al.*, 2019). Entretanto, considerando a natureza dinâmica e o fluxo de água contínuo dos ambientes lóticos, os vestígios químicos derivados de impactos agudos podem ser facilmente dissipados (KOSTIĆ *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017). Nesse caso, a detecção de impactos por meio dos parâmetros usuais pode ser limitada, uma vez que depende da ocorrência do impacto no momento da amostragem. Dada essa problemática, o uso dos organismos (bioindicadores), e de suas respostas (biomarcadores), podem fornecer informações para a avaliação da qualidade ambiental (VIANA *et al.*, 2018a). Os organismos funcionam como testemunhas dos impactos passados, capturando impactos incidentes em períodos anteriores ao da amostragem. Além disso, os biomarcadores podem capturar os efeitos de múltiplos estressores que muitas vezes atuam de forma sinérgica sobre os organismos (VIANA *et al.*, 2018b). Por essa razão, diversos estudos têm avaliado a performance de biomarcadores na detecção de impactos ambientais (BALLESTEROS *et al.*, 2017; KOSTIĆ *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017; DALZOCHIO *et al.*, 2018; JOVANOVIĆ *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2018; BAUDOU *et al.*, 2019; FRANCISCO *et al.*, 2019; SPOSITO *et al.*, 2019). Muitos desses estudos têm recomendado o uso de um conjunto de biomarcadores como uma alternativa para lidar com a complexidade dos impactos ambientais e seus efeitos (DALZOCHIO *et al.*, 2018).

As consequências das mudanças no uso do solo sobre os organismos podem envolver diferentes mecanismos, tais como processos genéticos e bioquímicos (LIMA *et al.*, 2018). Do ponto de vista genético, as mudanças na qualidade da água em decorrência das alterações da paisagem podem levar a danos genotóxicos e mutagênicos (VIANA *et al.*, 2018b). Além disso, a exposição a situações estressantes, incluindo poluentes, pode gerar danos oxidativos aos organismos que desencadeiam uma cascata de processos bioquímicos e metabólicos afim de neutralizar os danos oxidativos. Dentre as respostas bioquímicas e metabólicas pode-se citar o

sistema antioxidante que possui enzimas cuja função é inibir ou reduzir os danos provocados pelos radicais livres (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Portanto, os marcadores genéticos e bioquímicos podem capturar as alterações na paisagem, sendo potencialmente úteis para o monitoramento ambiental.

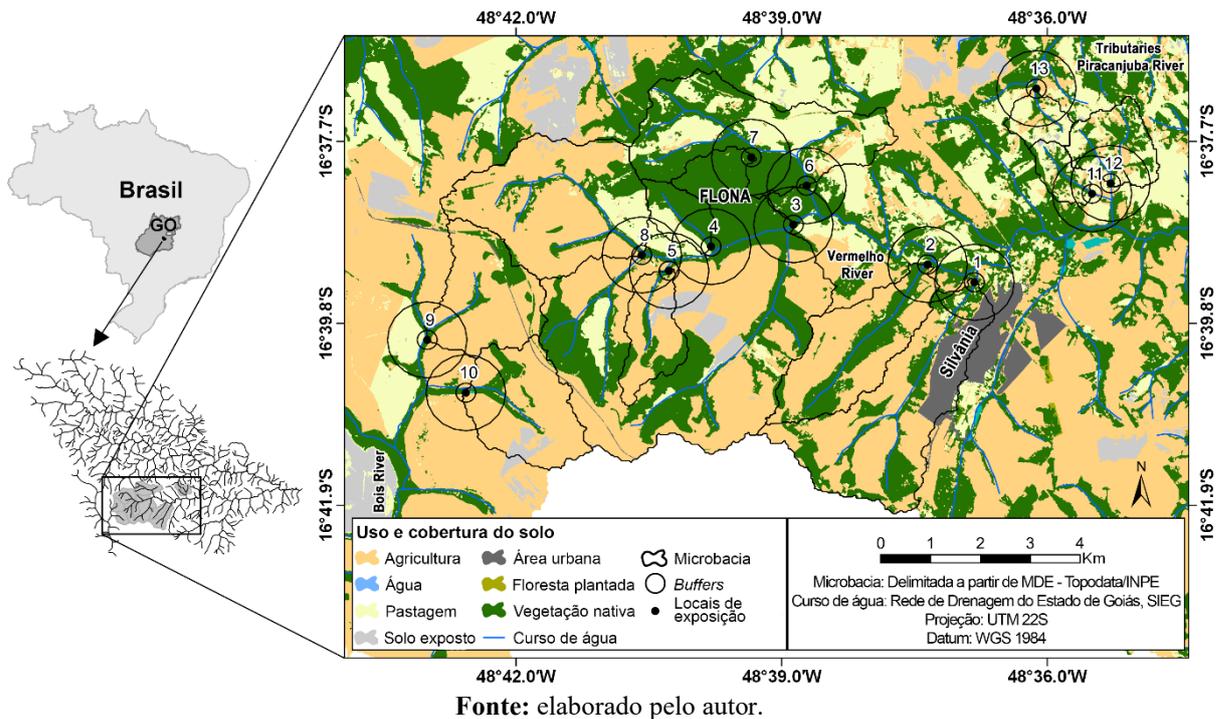
Nesse estudo, testamos se os biomarcadores genéticos e bioquímicos de peixes são capazes de refletir o grau de antropização da paisagem e se essas respostas são consistentes ao longo das estações. Para isso, utilizamos o peixe *Astyanax lacustris* (LÜTKEN, 1875) como bioindicador, os quais foram mantidos em gaiolas expostas em riachos que drenam áreas com diferentes níveis de antropização da paisagem, incluindo usos para agricultura, pecuária e área urbana. A nossa hipótese é que as alterações ambientais decorrentes da antropização da paisagem resultam em alterações nos marcadores genéticos e bioquímicos, cujos efeitos são mais fortes durante a estação chuvosa, quando a lixiviação de sedimento e poluentes potencializa a deterioração da qualidade da água. Especificamente, esperamos que peixes expostos em riachos com maior grau de antropização da paisagem apresentem maior frequência de danos genéticos, maiores danos oxidativos e maior alteração na atividade de enzimas antioxidantes, principalmente na estação chuvosa.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A área de estudo está localizada no município de Silvânia, estado de Goiás, Brasil. Selecionamos 13 trechos de riachos diferentes que drenam áreas onde predominam agricultura, pastagem, vegetação natural e área urbana, inseridos no bioma Cerrado (Figura 1.1). Os locais de exposição foram selecionados através da identificação, por meio de imagens de satélite (Google Earth Pro), de trechos nos riachos que permitissem o fácil acesso em campo e que também contemplassem o gradiente de uso do solo da região. O experimento foi realizado em dois momentos: final da estação seca (outubro de 2018) e durante a estação chuvosa (janeiro de 2019).

Figura 1.1 – Mapa da área de estudo no estado de Goiás (GO), Brasil. Os pontos pretos simbolizam os locais de exposição inseridos em matriz com diferentes graus de antropização na paisagem. Os círculos ao redor dos locais de exposição representam *buffers* de 200 e 800 m. A área de drenagem de cada local é mostrada com contorno preto. Essas delimitações foram utilizadas para caracterização do uso do solo para cada local de exposição.



Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Estadual de Goiás (UEG) sob o número 006/2018. E um exemplar da espécie *Astyanax lacustris* utilizado na pesquisa foi tombado como material testemunho na Coleção Zoológica da Universidade Estadual de Goiás sob o número UEG 888.

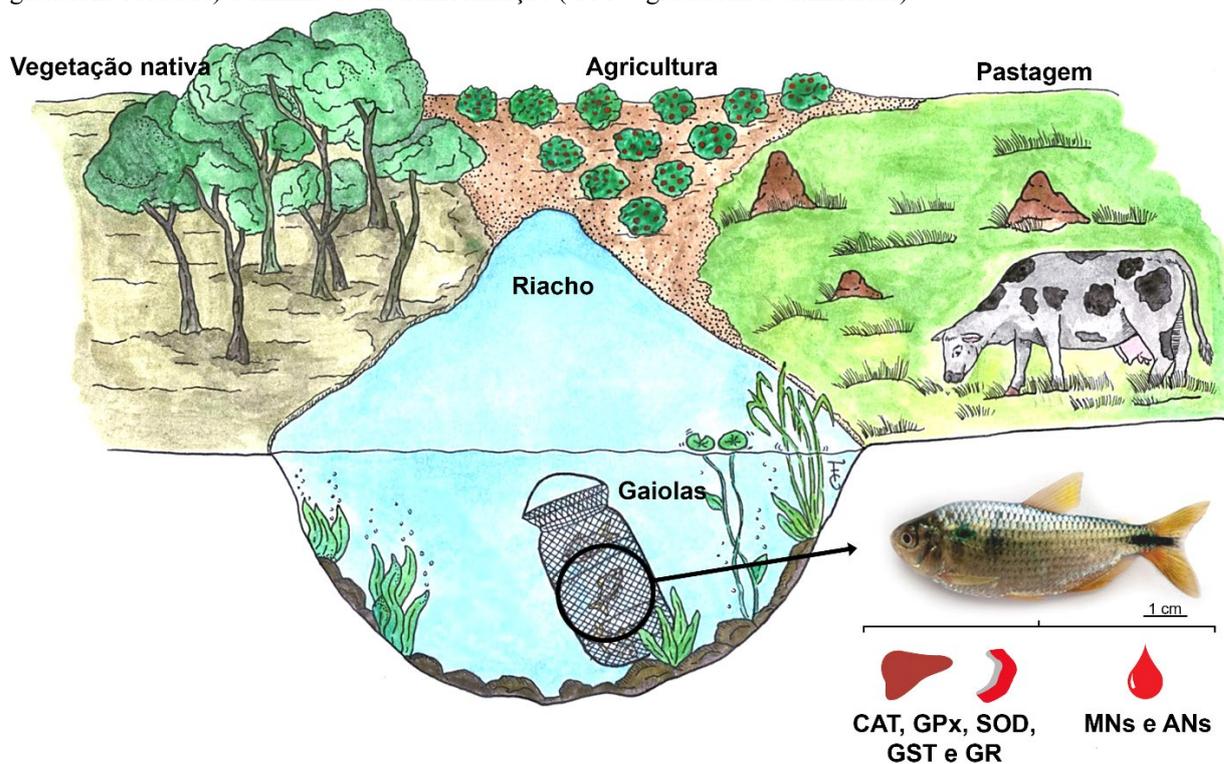
Organismo teste e procedimentos experimentais

A espécie *Astyanax lacustris* (Figura 1.2) foi utilizada como modelo no estudo. Pertencente à ordem Characiformes e à família Characidae, é popularmente conhecida como lambari-de-rabo-amarelo (BRITSKI et al., 1999). Essa espécie foi escolhida por ocorrer naturalmente na bacia da área de estudo, ter um tamanho corporal adequado para experimentação e se adaptar bem às condições de cativeiro (VIANA et al., 2018a). Além disso, o gênero *Astyanax* tem sido amplamente empregado como bioindicador em diversos estudos (DISNER et al., 2017; STEVANATO e OSTRENSKY, 2018; VIANA et al., 2018a, 2018b; SPOSITO et al., 2019).

Os espécimes adultos de *A. lacustris* utilizados no experimento foram adquiridos em um comércio especializado em iscas vivas, localizado em Anápolis, Goiás. O transporte dos peixes para a Floresta Nacional de Silvânia (FLONA) foi realizado em sacos plásticos de 20 L

contendo água do tanque de origem, com oxigenação. Durante o transporte, os peixes foram mantidos em jejum (KUBITZA, 2009). Os peixes utilizados na estação seca tinham comprimento padrão de $6,0 \pm 0,57$ cm e pesavam $5,3 \pm 2,21$ g, enquanto os da estação chuvosa apresentavam $7,1 \pm 0,64$ cm de comprimento e pesavam $9,06 \pm 2,86$ g.

Figura 1.2 – Esquema representativo do delineamento do trabalho. As gaiolas com 13 indivíduos da espécie *Astyanax lacustris* foram expostas em locais com diferentes graus de antropização no uso e cobertura da terra. Os peixes ficaram expostos nos locais por 96 h. Após o tempo de exposição, os peixes foram eutanasiados e coletou-se sangue para análise de micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (ANs) e fígado e brânquias para análise de enzimas antioxidantes (CAT = catalase, GPx = glutiona peroxidase, SOD = superóxido dismutase e GR = glutiona redutase) e enzima de biotransformação (GST = glutiona S-transferase).



Fonte: elaborado pelo autor.

Na FLONA os 175 peixes foram mantidos em uma caixa d'água de 350 L, equipada com aquecedor para manter a água a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, além de bomba de circulação e filtro biológico. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração (GIMBO et al., 2008). Após uma semana de aclimação, 13 peixes foram transferidos, aleatoriamente, para sacos plásticos com aeradores e água da caixa d'água, e transportados para os 13 locais de exposição.

Nos locais de exposição, os peixes foram transferidos para gaiolas de arame nº 5, com dimensões de 38×24 cm. Estudos anteriores indicam que peixes mantidos em gaiolas apresentam respostas de biomarcadores semelhantes aos peixes selvagens (VIEIRA et al., 2017). As gaiolas foram mantidas por 96 h nos riachos, em trechos com fluxo de água reduzido (VIEIRA et al., 2016).

Após o período de exposição, os peixes foram eutanasiados por imersão em água a 1 °C (ACERETE et al., 2004; ASHLEY, 2007; RIBAS et al., 2007), de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2018). O sangue foi coletado por secção cervical, seguido da confecção das extensões sanguíneas. O fígado e as brânquias foram retirados para análises bioquímicas e congelados em nitrogênio líquido no campo. No laboratório, os tecidos foram armazenados em freezer a -80 °C. Para cada local de exposição, obtivemos dois criotubos contendo os tecidos dos indivíduos (*pool*), um com brânquias e outro com fígado (Figura 1.2).

Caracterização ambiental

Após o tempo de exposição dos peixes, foram coletadas amostras de água em todos os locais de exposição para análises físico-químicas e microbiológicas, incluindo demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅), nitrogênio total, sólidos totais, fósforo, ferro, manganês, cádmio, chumbo, zinco, cobre, cromo total e trivalente, agrotóxicos (2,4-D e glifosato) e coliformes totais. As amostras foram acondicionadas em frascos específicos para cada parâmetro, armazenadas em caixas térmicas com gelo e enviadas para processamento pela empresa Life Projetos Limnológicos, especializada em monitoramento limnológico e qualidade da água, localizada em Goiânia, Goiás. Também ao final da exposição, foram obtidos dados de parâmetros limnológicos, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido saturado (OD % sat) e turbidez, utilizando uma sonda multiparâmetro (*Eureka - Manta 2*). A interpretação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos foi baseada na Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) para Classe 2 de água doce.

Os valores dos parâmetros referentes a OD % sat, coliformes totais, pH, DBO₅, nitrogênio total, fosforo total, temperatura e sólidos totais foram usados para obtenção do Índice de Qualidade da Água (IQA). O cálculo que utilizamos para obtenção do IQA foi estabelecido pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2018). O cálculo leva em conta somente estes parâmetros, os quais possuem curvas de variação da qualidade das águas, bem como seu peso relativo correspondente já estabelecidos (Tabela A.1, Anexo) (CETESB, 2018). Calculamos o IQA com base na seguinte equação:

$$IQA = \prod_{i=1}^n q_i^{w_i}$$

Onde:

IQA: Índice de Qualidade da Água, número entre 0 e 100;

q_i : qualidade do i -ésimo parâmetro, número entre 0 e 100 (obtidos na curva de variação de cada parâmetro) em função de sua concentração ou medida. Para obtenção dos valores de q_i , utilizamos equações obtidas das curvas de variação (Tabela B.1, Anexo);

w_i : peso correspondente ao i -ésimo parâmetro, número entre 0 e 1, i -ésimo parâmetro;

n : número de variáveis que entram no cálculo de IQA.

Obtenção do gradiente de antropização da paisagem

Foi utilizado três escalas espaciais para caracterização do uso do solo de cada local de exposição: 1) escala de drenagem, que consistiu na microbacia a montante do local de exposição, a qual obtivemos a partir do Modelo Digital de Elevação (MDE); 2) *buffer* circular de 200 m a partir do local de exposição; *buffer* circular de 800 m a partir do local de exposição (Figura 1.1). Para mapear o uso do solo na área de estudo, foi utilizado uma imagem do satélite *Sentinel-2A*, com 10 m de resolução espacial gerada em 31/08/2018 e disponibilizada gratuitamente pelo Serviço Geológico dos Estados Unidos (disponível em: <https://earthexplorer.usgs.gov/>). De modo a facilitar o processo de classificação, foi considerado uma cobertura de nuvens inferior a 10% (Santos, *et al.*, 2019). Foi realizado uma composição colorida de falsa cor RGB (*red green blue*) para visualizar as classes da imagem gerada. As bandas espectrais utilizadas para a composição RGB seguem a proposição de Addabbo *et al.* (2016) e foram: *Red* - banda 8 (comprimento de onda: 842 nm), *Green* – banda 4 (comprimento de onda: 665 nm) e *Blue* – banda 3 (comprimento de onda: 560 nm).

Para classificação do uso do solo, foi utilizado o método supervisionado. Realizou-se o treinamento, com definição das classes do mapeamento, através de uma análise visual da imagem, a fim de “treinar” o algoritmo classificador na distinção dos alvos de interesse. Foi coletado ao menos 50 polígonos representativos de cada classe. A imagem classificada foi convertida em formato *raster*, para vetor no formato *shapefile* para correções e análises posteriores (SANTOS, 2018). Categorizamos as classes de uso do solo em sete categorias, englobando áreas naturais e antropizadas: (1) Agricultura – incluindo áreas com culturas anuais e perenes; (2) Água – cursos d’água visíveis na imagem como lagos, córregos e rios; (3) Área urbana – áreas construídas, como estradas, residências, indústrias; (4) Pastagem – são áreas ocupadas por pastos destinados à criação de gado; (5) Solo exposto – locais de solo nu, sem cobertura vegetal ou construções; (6) Vegetação nativa – áreas cobertas com vegetação nativa do Cerrado, sem diferenciação das fitofisionomias; (7) Floresta plantada - áreas de plantios florestais com fins econômicos, como as plantações do gênero *Eucalyptus*.

As etapas de sensoriamento remoto e geoprocessamento foram realizadas no *software* QGIS versão 3.4 (QGIS *Development Team*, 2019). No módulo GRASS (GRASS GIS, 2017), foi empregado o Modelo Digital de Elevação (MDE) folha 16S495, fornecido pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (disponível em: <http://www.webmapit.com.br/inpe/topodata/>), para a delimitação das bacias hidrográficas. Realizamos a classificação de uso e cobertura do solo com auxílio do *plugin Dzetsaka* (KARASIAK, 2016).

Após obtermos a porcentagem de cada classe de uso do solo para as três escalas espaciais (drenagem, *buffer* de 200 e 800 m), fizemos uma correlação de Pearson para cada classe de uso do solo entre as escalas que demonstrou alta colinearidade ($r > 0.70$) entre a escala drenagem e *buffers* circular de 800 m. Desta forma, consideramos nas análises posteriores somente a escala de drenagem e o *buffer* circular de 200 m.

Finalmente, calculamos o Índice de Perturbação Antropogênica (IPA) utilizando as classes de uso do solo antrópico agricultura, pecuária e área urbana. Esse índice combina os diferentes tipos de uso do solo e as duas escalas (drenagem e o *buffer* circular de 200 m) em um único parâmetro atribuindo pesos específicos para os tipos de uso do solo e para as escalas. Calculamos o IPA com base na seguinte equação:

$$IPA = \left(\frac{1 \times \left(\frac{(3 \times Urb_{Cat}) + (2 \times Arg_{Cat}) + Pas_{Cat}}{3} \right) + 2 \times \left(\frac{(3 \times Urb_{Loc}) + (2 \times Arg_{Loc}) + Pas_{Loc}}{3} \right)}{3} \right)$$

Onde:

IPA: Índice de Perturbação Antropogênica;

Urb_{Cat} , Arg_{Cat} e Pas_{Cat} : são a % da área de captação ocupada por área urbana, agricultura e pastagem, respectivamente;

Urb_{Loc} , Arg_{Loc} e Pas_{Loc} : são a % da área no *buffer* de 200 m ocupada por área urbana, agricultura e pastagem, respectivamente.

Primeiramente calculamos a média ponderada dos tipos de uso do solo antrópico para cada escala separadamente, considerando pesos 1, 2 e 3 para pastagem, agricultura e área urbana, respectivamente. Os pesos representam o potencial efeito de cada classe sobre os peixes, sendo impacto área urbana > agricultura > pecuária. Organismos vivendo em riachos associados a áreas urbanas são sujeitos aos efeitos tóxicos dos efluentes urbanos (FRANCISCO *et al.*, 2019). Em áreas de agricultura, a lixiviação de agrotóxicos pode impactar os organismos aquáticos, mas esse processo pode ser atenuado pela mata ripária; os impactos da pecuária envolvem principalmente alterações na estrutura física dos riachos como perda da vegetação

ripária e consequente aumento da temperatura, assoreamento, com menores impactos em termos de integridade química (CASATTI *et al.*, 2006). Posteriormente, combinamos as duas escalas por meio de média ponderada do índice parcial gerado com base nos procedimentos descritos anteriormente, atribuindo peso 1 para drenagem e peso 2 para o *buffer* circular de 200 m. O maior peso para o *buffer* de 200 m se justifica pelo fato de que as alterações no ambiente terrestre mais próximo aos rios tendem a exercer maiores efeitos sobre a biodiversidade aquática (BARBOSA *et al.*, 2019). Dessa forma, o IPA consiste em uma medida univariada que representa o grau de antropização da paisagem, sendo que quanto maior o valor do IPA, maior é o impacto antrópico de um dado local de exposição.

Biomarcadores

Peroxidação lipídica

Para a análise da peroxidação lipídica (marcador bioquímico) foi dosado as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para isso, foi utilizado a reação entre malondialdeído (MDA) e demais aldeídos, produtos da peroxidação lipídica, e o ácido tiobarbitúrico (TBA) (HEATH e PACKER, 1968). 50 mg de brânquias e fígados foram homogeneizados, separadamente, com auxílio de micro homogeneizador (*Marconi - MA1102*) em 150 µL (1:3 m:v) de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Após a homogeneização, 150 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,03 M foram adicionados às amostras. As amostras foram incubadas a 90 °C por 40 min. Posteriormente, foram resfriadas em gelo, e foram adicionados 500 µL de álcool n-butílico. Após, as amostras foram agitadas e centrifugadas a $2.800 \times g$ (*Thermo Scientific - Heraeus Megafuge 16R*) por 10 min para a extração do produto formado entre o MDA e o TBA no butanol.

Os níveis de peroxidação lipídica foram quantificados a partir da leitura, por espectrofotometria, (*Molecular devices – SpectraMax*) de 200 µL de sobrenadante em 535 nm, utilizando microplaca de 96 poços com fundo chato (*Corning – Costar 3599*). A quantificação foi realizada através da comparação com uma curva padrão, com diferentes concentrações, de MDA obtida pela hidrólise de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (TEP) 0,1 mM reagido com o TBA submetido às mesmas condições que as amostras. Os dados foram expressos em nmol mg^{-1} de tecido. O seguinte cálculo foi empregado para calcular o valor final de MDA de cada amostra:

$$\left\{ \frac{\left(\frac{m-\beta}{\alpha} \right)}{\left[\left(\frac{mg}{Vb} \right) \times Va \right]} \right\}$$

Onde:

m: média da absorbância;

α : valor do coeficiente angular da curva padrão;

β : valor do coeficiente linear da curva padrão;

mg: miligrama de tecido utilizado;

Vb: volume de butanol;

Va: volume usado de amostra.

Atividade enzimática

Preparo dos homogeneizados de tecido para SOD, CAT, GPx, GST e GR

Para as análises, 80 mg de amostras de fígado e brânquias foram homogeneizados, com auxílio de micro homogeneizador (*Marconi - MA1102*), em 320 μ L de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 contendo sacarose 0,5 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,15 M e inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a 0,03 M (proporção de 1:4 m:v) por 25 seg. Antes de iniciar a homogeneização, os microtubos, contendo as amostras e o tampão, foram mergulhados em nitrogênio líquido por 15 seg para manter a temperatura baixa.

Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ (*Thermo Scientific - Heraeus Megafuge 16R*) por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e novamente a centrifugamos em $2.5830 \times g$ por 1 h a 4 °C, de forma a se obter as frações de precipitado e sobrenadante. Para medir as atividades das enzimas, separamos alíquotas de 50 μ L do sobrenadante. Armazenamos as alíquotas no freezer -80 °C até serem utilizadas

Quantificação proteica

Para cada estação (seca e chuvosa) calculamos a concentração de proteínas das alíquotas, para cada amostra, pelo método de Bradford (1976). O princípio da técnica se baseia na capacidade que o corante *Coomassie Brilliant Blue*, presente no reagente de Bradford, de se ligar às proteínas. A ligação do corante a proteína provoca mudança na absorbância máxima do corante de 465 para 594 nm. É o aumento na absorção que é monitorado. O corante é castanho e quando se liga à proteína, fica azul. Para a quantificação fizemos uma curva padrão com concentrações proteicas conhecidas de soro albumina bovina 1 mg mL⁻¹ (BSA) em duplicata.

A microplaca (*Corning – Costar 3599*) foi preparada adicionando 1 μ L de amostra de fígado em 249 μ L de Reagente de Bradford comercialmente adquirido. Para brânquias usamos 1,5 μ L de amostra em 248,5 μ L de Bradford, ambas em duplicata. Utilizamos 250 μ L de Bradford como branco. Após, a microplaca com a curva padrão e as amostras foi colocada na leitora (*Molecular devices – SpectraMax*) onde ficou agitando por 10 min. Passado o tempo foi

realizado a leitura em 595 nm. Obtida as absorvâncias, calculamos então a concentração de proteínas pela seguinte fórmula:

$$\frac{\left(\frac{[(m-\beta)] \times V_t}{\alpha} \right)}{V_a}{1.000}$$

Onde:

m: média da absorvância;

α : valor do coeficiente angular da curva padrão;

β : valor do coeficiente linear da curva padrão;

Vt: volume total utilizado;

Va: volume usado de amostra.

Os dados da concentração de proteína nas amostras foram expressos em mg mL⁻¹, por isso dividimos o valor por mil no final.

Avaliação da atividade SOD

A enzima SOD catalisa a dismutação do O₂^{•-} em O₂ e H₂O₂ (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Para quantificação da atividade da SOD, utilizou-se o *SOD Assay Kit-WST* (Sigma Aldrich 19160) com algumas alterações no protocolo que vem junto ao kit. Neste ensaio é medido a interação de oxido redução entre o O₂^{•-} com o Tetrazólio-1 solúvel em água, WST-1 (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico) que é convertido em formazan após a redução. O formazan é uma substância cromófora. Na reação, os radicais superóxido são formados através da reação da xantina oxidase como o oxigênio molecular, logo a taxa de redução do O₂ a O₂^{•-} é proporcional a atividade da xantina oxidase. A SOD atua reduzindo a concentração de O₂^{•-}, diminuindo assim a formação de formazan. Logo a metodologia do kit é indireta, no qual a quantificação se dá por percentual de inibição de SOD (IC₅₀ – 50% concentração inibitória) por um método colorimétrico com leitura a 450 nm após período de incubação de 20 min a 37 °C. A absorvância é proporcional à quantidade do ânion superóxido, e a atividade da SOD atua inibindo o radical.

No kit há cinco soluções: solução WST, solução enzimática, solução tampão e tampão de diluição. No dia do teste foi preparado duas soluções: i) solução de trabalho WST: foi diluindo 1 mL da solução WST em 19 mL da solução tampão; ii) solução de trabalho enzimática: 15 µL de solução enzimática foi diluída em 2,5 mL de tampão de diluição.

Alíquotas de 5 µL de fígado e brânquias foram diluídas em 20 µL de tampão de homogeneização (diluição 5x).

Após preparar as amostras e as soluções, preparamos o ensaio em uma microplaca de 96 poços (*Corning – Costar 3599*). Para o ensaio é necessário três brancos. Fizemos o branco dois para cada amostra. As soluções foram pipetadas na microplaca da seguinte forma:

- 2 µL de amostra nos poços do branco 2 e nos poços de amostra;
- 2 µL de H₂O destilada para os poços de branco 1 e branco 3;
- 200 µL de solução de trabalho WST em todos os poços de branco 1, 2, 3 e nos poços de amostra;
- 25 µL de tampão de diluição nos poços do branco 2 e branco 3;
- 25 µL da solução enzimática nos poços de amostra e no branco 1.

Após, a microplaca foi agitada por 5 seg em movimentos circulares e incubada a 37° C por 20 min na própria leitora. Finalizado o tempo, a leitura foi feita a 450 nm. Os resultados foram expressos em % inibição. Para calcular a % de inibição utilizamos a seguinte fórmula:

$$\left\{ \frac{[(Ab1 - Ab3) - (Aa - Ab2)]}{(Ab1 - Ab3)} \right\} \times 100$$

Onde:

Ab1: Absorbância branco 1

Ab2: Absorbância branco 2

Ab3: Absorbância branco 3

Aa: Absorbância amostra

Após obter a porcentagem de inibição utilizamos a seguinte fórmula para obtenção da atividade enzimática em U mg⁻¹ proteína:

$$\left[\frac{(U \times d)}{(Va \times P)} \right]$$

Onde:

U: unidade;

d: diluição;

Va: volume usado de amostra em mL;

P: quantidade de proteína na amostra.

Para calcular a unidade de cada amostra basta dividir a % de inibição por 50, devido que cada U (1 µmol de produto formado por minuto) de SOD é igual a 50% de inibição.

Avaliação da atividade CAT

A CAT promove a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 (STEGEMAN e HAHN, 1994). Com base nisso é possível quantificar sua atividade analisando a velocidade de decomposição de H_2O_2 por decréscimo de absorbância em 240 nm (BEUTLER, 1975). Para o ensaio foi utilizado um meio de reação contendo H_2O_2 10 mM; Tris-HCl 1 M, pH 8,0 e EDTA 5 mM, pH 8,0 incubado a 27 °C (a solução foi mantida no banho maria durante o processo). A análise foi feita em cubeta de quartzo. 3 mL do meio de reação foi usado como branco. As amostras de fígado foram diluídas. Para a diluição foi pipetado 1 μL da alíquota de homogeneizado de fígado em 99 μL de tampão de homogeneização (diluição de 100 \times). Homogeneizados de brânquias não foram diluídos.

Para a análise de fígado foram utilizados 2.985 μL de meio de reação e 15 μL de homogeneizado de fígado diluído. Já para análise de brânquias foram utilizados 2.965 μL de meio de reação e 35 μL de homogeneizado de brânquias sem diluir.

A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de 0,071 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 240 nm (*IL-592 – Kazuaki*) por 1 min. Os resultados foram expressos em U mg^{-1} de proteína. Uma unidade de CAT representa a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μM de H_2O_2 por min.

Avaliação da atividade GPx

A GPx realiza a catálise do metabolismo de peróxidos lipídicos (ROOH) e do H_2O_2 (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Sua atividade é quantificada pelo decréscimo de absorbância promovido pela oxidação da GSH reduzida à sua forma oxidada (GSSG). Para a GPx continuar atuando a GSSG precisa ser reduzida a GSH. Logo a glutathiona redutase (GR) em presença de NADPH catalisa a reação de redução de GSSG a GSH (SIES *et al.*, 1979). Com base nisso, a atividade da GPx foi determinada pela reação de oxidação do NADPH pela GR. O hidroperóxido de terc-butila (tBOOH) foi usado como substrato.

O meio de reação (solução 01) continha tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0; EDTA 0,005 M, pH 7,0; NADPH 0,2 mM; GR 0,2 U mL^{-1} ; e GSH 0,001 M. Já a solução 2 continha fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 e tBOOH 1mM. A análise foi realizada em duplicada em microplaca de 96 poços (*Corning – Costar 3599*). Dois brancos foram utilizados: um com tampão fosfato e outro, para o branco da amostra, com 5 μL de tampão de homogeneização + 10 μL de solução 2 + 180 μL de solução 1. Para fígado e brânquias foram utilizados 5 μL da alíquota de homogeneizado + 10 μL de solução 2 + 180 μL de solução 1. O volume final dos poços na microplaca eram de 195 μL .

A atividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm (*Molecular Devices – SpectraMax*) por 3 min a 25 °C. Os resultados foram expressos em mU mg^{-1} de proteína, onde uma unidade de GPx corresponde à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μM de NADPH por min.

Avaliação da atividade da GR

A atividade da GR foi determinada pela oxidação do NADPH, durante a reação de redução da GSSG a GSH mediada pela GR, detectada a 340 nm (BEUTLER, 1969). Para o teste, foi preparado o meio de reação (solução 1) contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5; EDTA 0,005 M, pH 7,0; GSSG 0,2 mM; e GSH 15 mM. A solução com o substrato (solução 2) continha NADPH 0,1 mM, tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5; e EDTA 0,005 M, pH 7,0. O sistema foi montado em duplicata em microplaca (*Corning – Costar 3599*). Dois brancos foram utilizados: um com 100 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5; EDTA 0,005 M, pH 7,0 e o outro com 2 μL de tampão de homogeneização + 78 μL de solução 1 + 20 μL de solução 2. Para as amostras de fígado e brânquias, foram utilizados 2 μL da alíquota + 78 μL de solução 1 + 20 μL de solução 2. Antes de adicionar a solução 2, a microplaca foi encubada com as amostras na própria leitora durante 10 min a 25 °C.

A leitura foi realizada após a adição da solução 2, durante 5 min. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular a atividade enzimática. Os resultados foram expressos em mU mg^{-1} de proteína, sendo que uma unidade de GR representa a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μM de NADPH por min.

Avaliação da atividade da GST

A atividade da GST foi determinada pela reação de conjugação da GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST, formando o complexo S-2,4-dinitrofenil-glutationa, que foi detectado a 340 nm (KEEN *et al.*, 1976). Para determinar a atividade da GST foi necessárias duas soluções. A solução 1 (meio de reação) continha tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5 e GSH 2,22 mM. Já a solução 2 era composta pelo mesmo tampão fosfato de potássio da solução 1, entretanto com CDNB 2,22 mM. A análise foi feita em microplaca de 96 poços (*Corning – Costar 3599*) em duplicata. Foi utilizado dois brancos: o primeiro branco continha 110 μL de tampão fosfato de potássio e o branco de amostra continha 2 μL de tampão de homogeneização + 58 μL de solução 1 + 50 μL de solução 2. Para as amostras de fígado e brânquia, foram utilizados 2 μL da alíquota + 58 μL de solução 1 + 50 μL de solução 2. Antes de adicionar a solução 2, a microplaca foi encubada com as amostras na própria leitora durante 5 min a 25 °C.

A atividade enzimática foi medida utilizando o coeficiente de extinção molar do CDNB, de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 340 nm, durante 5 min a 30°C . Os resultados foram expressos em U mg^{-1} de proteína, sendo que uma unidade de GST corresponde à quantidade de enzima capaz de conjugar $1 \mu\text{M}$ de CDNB por min.

Cálculo para atividade enzimática

O cálculo da atividade enzimática se baseia na relação linear existente entre a absorbância medida no espectrômetro e a concentração da substância absorvente na solução. É levado em consideração no cálculo o coeficiente de extinção molar característico de cada substância, volumes, quantidade de proteína e diluições na cubeta ou microplaca utilizadas. A seguinte equação foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática

$$\frac{\left\{ \frac{[(A_i - A_f) \times V_t]}{\epsilon \times V_a} \right\}}{P}$$

Onde:

Af: absorbância final;

Ai: absorbância inicial;

Vt: volume total utilizado;

ϵ : Coeficiente de extinção molar. O valor é referente a molécula que está sendo absorvida na reação;

Va: volume usado de amostra;

P: quantidade de proteína na amostra.

OBS: Se o resultado for multiplicado por 1.000, deve ser corrigido a unidade de $10^{-3} \text{ U mg}^{-1}$ de proteína para mU mg^{-1} de proteína.

Depois que realizamos o cálculo para atividade enzimática corrigimos o cálculo da atividade enzimáticas das amostras que tiveram que ser diluídas. Multiplicamos o valor final pelo fator de diluição, ou seja, quantas vezes a amostra foi diluída.

Biomarcadores citogenéticos

Os danos genotóxicos foram avaliados por meio das análises de micronúcleos (MNs) e anormalidades nucleares (ANs) em eritrócitos. Para a coleta de sangue, foi realizada uma incisão com uma lâmina de bisturi na região cervical. O sangue que vertia foi coletado com uma micropipeta ($5 \mu\text{L}$) e transferido para um microtubo contendo $2 \mu\text{L}$ de heparina. Posteriormente, em duplicata, $2 \mu\text{L}$ do conteúdo do microtubo foram transferidos para lâminas

de microscopia com ponta fosca (duas lâminas por peixe). Com o auxílio de outra lâmina, inclinada a 25° e encostada no sangue, foi realizado o esfregaço sanguíneo.

Em laboratório, os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol absoluto por 10 min. Após a secagem, as lâminas foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 10% por 11 min a 60 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada. Após estarem secas, as lâminas foram imergidas em reativo de *Schiff* (corante) por 2 h em local escuro. Passado o tempo, as lâminas foram lavadas três vezes para remover o excesso de corante. Essas etapas são conhecidas como reação de Feulgen.

A análise das lâminas de microscopia foi realizada utilizando um microscópio óptico (*Zeiss – 37081 Axio Lab.A1*) com objetiva de imersão (100 ×). A frequência de eritrócitos micronucleados e outras anormalidades nucleares foi determinada pela análise de 3.000 células por peixe (1.500 células por lâmina). As anormalidades nucleares encontradas foram fotomicrografadas e classificadas de acordo com Carrasco *et al.* (1990) como sendo núcleo *notched*, *lobed*, *blebbed* e *vacuolated* e de acordo com Tolbert *et al.* (1992) como binucleadas e núcleo *broken-eggs*. Para a análise consideramos apenas eritrócitos com membrana celular e nuclear intacta, no intuito de não serem confundidos com artefatos da técnica. Consideramos como micronúcleos as estruturas circulares próximas ao núcleo, semelhantes a ele, com a mesma refringência e diâmetro inferior. Para calcular a frequência de micronúcleos utilizamos a seguinte razão:

$$FM = \left(\frac{\bar{x}M}{\bar{x}O} \right) \times 100$$

Onde:

$\bar{x}M$: média dos eritrócitos micronucleados de cada local;

$\bar{x}O$: média dos eritrócitos totais observados de cada local.

Calculamos a frequência de anormalidades nucleares, após somarmos todas as alterações, da seguinte maneira:

$$FAN = \left(\frac{\bar{x}AN}{\bar{x}O} \right) \times 100$$

Onde:

$\bar{x}AN$: média dos eritrócitos com anormalidades nucleares de cada local;

$\bar{x}O$: média dos eritrócitos totais observados de cada local.

Resposta integrada de biomarcadores (IBR)

As respostas bioquímicas (MDA, CAT, GPx, SOD, GST e GR) de brânquias e fígados foram combinadas por meio do Índice de Resposta Integrada do Biomarcador (Integrated Biomarker Response - IBR) (BELIAEFF e BURGEOT, 2002). Esse índice consiste no cálculo da área de um *starplot* cujas extremidades representam cada um dos marcadores. Tendo em vista que a ordem em que os marcadores são posicionados interfere no cálculo do IBR, utilizamos os procedimentos propostos por Devin *et al.* (2014) que consiste na mediana do IBR obtido para todas as combinações possíveis dos marcadores. Valores mais altos de IBR indicam níveis mais altos de estresse. Calculamos o índice de IBR no *software* R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019) e ambiente RStudio versão 1.2.1335 (RStudio Team, 2019).

Análises estatísticas

A associação do grau de antropização da paisagem, medido pelo Índice de Perturbação Antropogênica (IPA), com os biomarcadores foi avaliada por meio de modelos de regressão. Testamos os modelos quanto aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando os testes de Shapiro-Wilk e Breusch-Pagan, respectivamente. Para os dados normalmente distribuídos e homocedásticos, utilizamos regressão linear simples entre as variáveis respostas (biomarcadores) e a variável explanatória IPA. Caso os pressupostos fossem violados, mesmo após a transformação (log), utilizamos modelos de regressão generalizados (GLM). Realizamos também uma correlação de Pearson entre o IPA e IQA, pois os efeitos do uso solo podem ser mediados pela deterioração da qualidade da água. Realizamos essas análises de forma separada para cada estação. Realizamos as análises estatística no *software* R versão 3.6.1 (R CORE TEAM, 2019) e ambiente RStudio versão 1.2.1335 (RSTUDIO TEAM, 2019).

1.3. RESULTADOS

Caracterização ambiental

O mapeamento do uso e cobertura da terra revelou que a agricultura, seguido por pastagem, são as atividades antrópicas mais desenvolvidas na área de estudo (Figura 1.1). O IPA variou de 0 a 50 % (Tabela A.1, Apêndice). O IPA foi negativamente associado com o IQA somente na estação chuvosa (chuvosa: $p < 0,05$, $r = - 0,62$; seca: $p > 0,05$, $r = 0,32$).

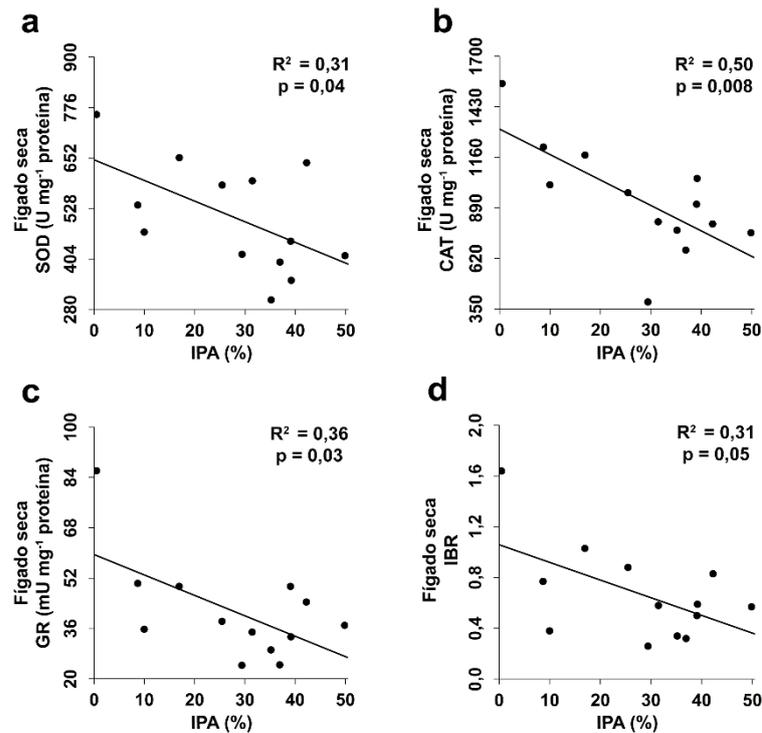
Os parâmetros limnológicos referentes a cádmio, chumbo, zinco, cobre, carbono orgânico, cromo total e trivalente, 2.4-D e glifosato estavam abaixo do limite de quantificação do aparelho ($<0,0005 \text{ mg L}^{-1}$, $<0,002 \text{ mg L}^{-1}$, $<0,01 \text{ mg L}^{-1}$, $<0,002 \text{ mg L}^{-1}$, $< 0,150 \mu\text{g L}^{-1}$, $< 55,00 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente), porém foi detectado ferro e manganês (Tabela B.1, Apêndice). Em relação aos demais parâmetros limnológicos, com base nos valores estabelecidos pelo

CONAMA 357/2005, quatro locais apresentaram valores de coliformes fecais acima do recomendado, quatro locais apresentaram valores de pH abaixo do limite ideal (entre 6 e 9) e dois locais apresentaram valores de manganês acima do limite máximo permitido na estação seca. Já na estação chuvosa, três locais tiveram valores de pH abaixo do limite ideal estabelecido na legislação e dois locais tiveram valores de manganês também acima do limite estabelecido pelo CONAMA (Tabela B.1, Apêndice). O resultado do IQA revelou que a qualidade da água de todos os locais estudados pode ser considerada como sendo boa, de acordo com os valores de referência estabelecidos pela CETESB (Tabela B.1, Apêndice).

Marcadores bioquímicos vs antropização da paisagem

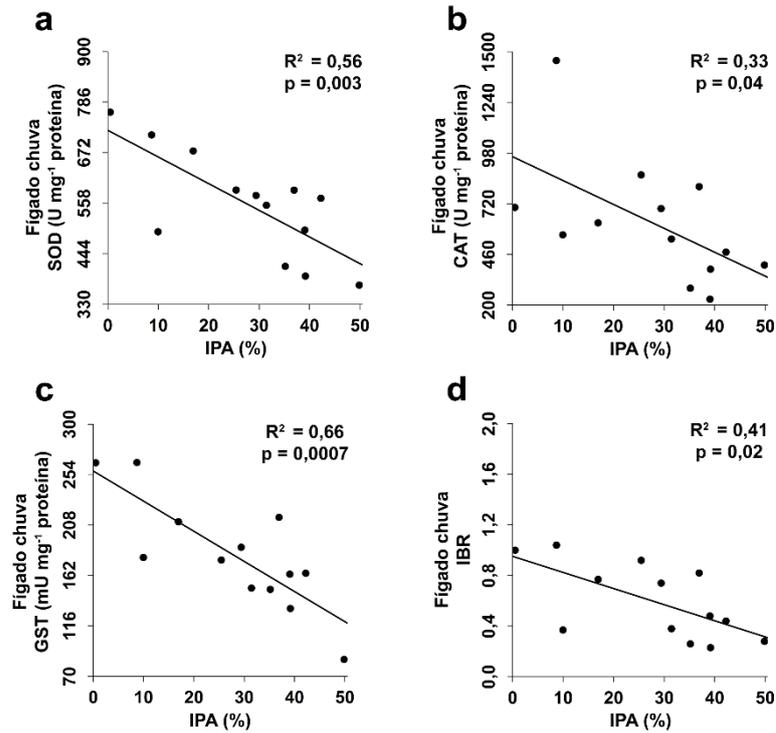
O IPA não exerceu influência sobre os marcadores bioquímicos e IBR das brânquias nas estações seca e chuvosa ($p > 0,05$). Entretanto o IPA exerceu efeito negativo sobre os seguintes marcadores de fígado: SOD, CAT, GR e IBR na estação seca ($R^2 > 30\%$, $p < 0,05$) (Figura 1.3); SOD, CAT, GST e IBR na estação chuvosa ($R^2 > 33\%$, $p < 0,05$) (Figura 1.4).

Figura 1.3 – Regressão linear simples entre as atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e a Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) em fígado de *Astyanax lacustris* na estação seca, após 96 h de exposição em locais com diferentes pressões antropicas (Índice de Perturbação Antropogênica – IPA), destacando a linha que representa o modelo de regressão com os respectivos valores de p e R^2 .



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 1.4 – Regressão linear simples entre as atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST) e a Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) em fígado de *Astyanax lacustris* na estação seca, após 96 h de exposição em locais com diferentes pressões antropicas (Índice de Perturbação Antropogênica – IPA), destacando a linha que representa o modelo de regressão com os respectivos valores de p e R².

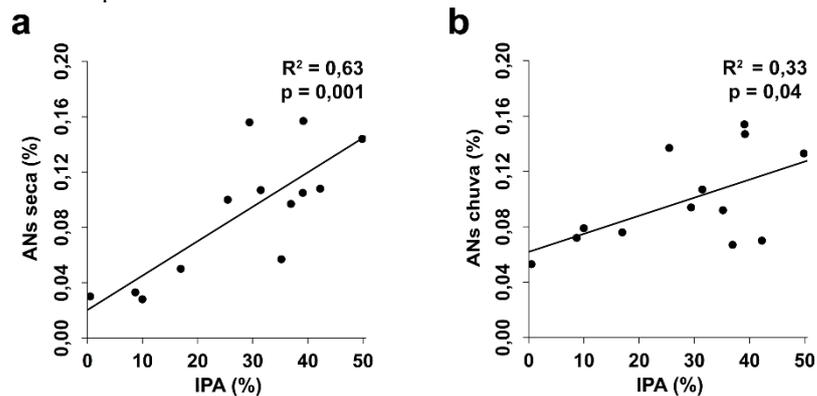


Fonte: elaborado pelo autor.

Biomarcadores citogenéticos vs antropização da paisagem

A frequência de MNs não é influenciada pelo gradiente de pressão antrópica do uso da terra nas estações seca e chuvosa ($p > 0,05$). Em contrapartida, o IPA associou-se positivamente com a frequência de ANs nas duas estações (seca: $R^2 = 0,63$, $p < 0,05$; chuvosa: $R^2 = 0,33$, $p < 0,05$) (Figura 1.5), ou seja, quanto maior o grau de antropização da paisagem, maior é a ocorrência das anormalidades nucleares.

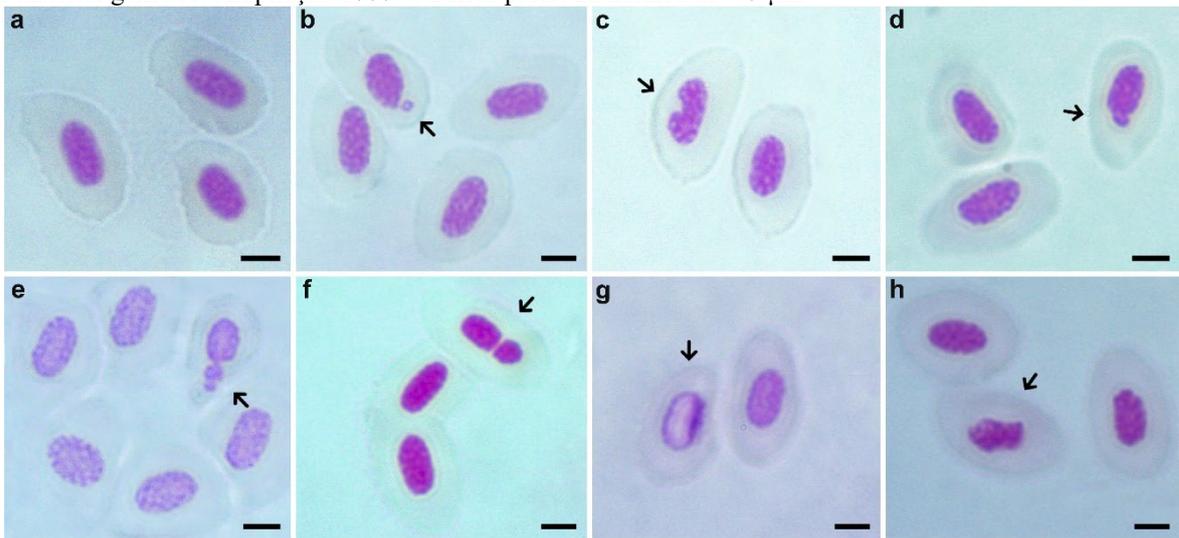
Figura 1.5 – Relação entre o Índice de Perturbação Antropogênica (IPA) e a frequência de anormalidades nucleares para a estação seca (a) e estação chuvosa (b), destacando a linha que representa o modelo de regressão com os respectivos valores de p e R².



Fonte: elaborado pelo autor.

As principais anormalidades encontradas nos eritrócitos de *A. lacustris* foram MN, célula binucleada, núcleo *notched*, *lobed*, *broken-eggs* e *blebbed* (Figura 1.6).

Figura 1.6 – Micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *A. lacustris* expostos por 96 h em áreas com diferentes graus de impacto antrópico: **a)** célula normal. **b)** célula micronucleada – o micronúcleo é uma estrutura circular visível no citoplasma e é semelhante ao núcleo principal, porém com tamanho inferior. **c)** célula com núcleo *notched* – a membrana nuclear apresenta uma invaginação profunda, como um entalhe. **d)** célula com núcleo *lobed* - o núcleo apresenta invaginação convexa e bem definida (lobulo). **e)** célula com núcleo *broken-eggs* – o núcleo apresenta broto, há a formação de um corpo arredondado que continua ligado ao núcleo através de um filamento de cromatina. **f)** célula com núcleo *blebbed* – a membrana nuclear apresenta formato irregular. **g)** célula binucleada – apresenta dois núcleos. **h)** célula com núcleo *vacuolated* – o núcleo apresenta um buraco desprovido de material genético. Ampliação 1000 ×. Barras pretas na horizontas = 5 µm



Fonte: elaborado pelo autor.

1.4. DISCUSSÃO

Apesar, em sua grande maioria, dos parâmetros limnológicos apresentarem conformidade com o que é preconizado na Legislação Brasileira (CONAMA 357/2005) e o IQA demonstrar que a qualidade das águas nos locais estudados é considerada boa, isso não indica que essas águas não estejam sofrendo efeitos da antropização ao redor dos corpos hídricos já que houve associação do IPA com o IQA na estação chuvosa. Isso reforça a ideia de que o efeito da antropização da paisagem sobre os biomarcadores dos peixes esteja sendo mediado pela perda da qualidade da água. De fato, a associação da antropização da paisagem com a qualidade da água na estação chuvosa pode estar associada ao fato de que a chuva intensifica o aporte de resíduos e substâncias por meio da lixiviação do solo adjacente aos cursos d'água além da ressuspensão de poluentes nos sedimentos e, com isso, alterando a qualidade da água (CORREDOR-SANTAMARÍA *et al.*, 2019). Na estação seca esse processo seria minimizado, o que provavelmente explica a ausência de associação da qualidade da água com a pressão antrópica da paisagem. Entretanto, considerando que as respostas dos marcadores em relação à antropização da paisagem foram similares em ambas as estações, podemos considerar também que a perda da qualidade da água tenha ocorrido por outros processos que

não a lixiviação influenciando outras variáveis que não foram medidas. Por exemplo, durante a estação seca, a redução do volume dos riachos pode concentrar produtos tóxicos amplificando seu efeito (LAKE, 2003). Nesse sentido, a presença de poluentes não avaliados por nós poderia ter causado as alterações biológicas.

Os marcadores do fígado responderam ao gradiente de antropização. Entretanto, diferentemente do esperado, riachos com maior grau de antropização da paisagem apresentaram menor atividade das enzimas antioxidantes para as duas estações, seca e chuvosa. Nós esperávamos que a antropização da paisagem estaria associada com maior dano oxidativo e, conseqüentemente, maior resposta antioxidante. Essa diminuição das defesas antioxidantes em locais mais antropizados pode ser associada com a tolerância dos peixes frente aos estressores. As estratégias de defesas e sobrevivência frente a estressores dependem da capacidade de mobilizar recursos energéticos, cuja demanda tende a aumentar com a intensidade e número de estressores (SOKOLOVA *et al.*, 2012; 2013). Uma dessas estratégias, frente a múltiplos estressores, pode envolver a conservação metabólica. Em tal condição, os peixes podem ter duas respostas: i) apresentar uma demanda alta de energia para a manutenção de suas defesas, além de sua capacidade metabólica aeróbica; ii) podem apresentar interrupção do metabolismo aeróbico acarretando diminuição da energia disponível abaixo da demanda energética. Em ambas as respostas o metabolismo anaeróbico parcial pode ser ativado para suprir os custos energéticos. Conseqüentemente ocorre uma supressão de toda atividade metabólica acima do nível basal levando ao bloqueio das respostas ao estresse onde os sistemas de defesa não são acionados, não há alterações no comportamento, crescimento e reprodução. Entretanto são esperados fortes efeitos deletérios celulares, por exemplo, danos ao DNA (PETITJEAN *et al.*, 2019). Portanto, aplicando esses processos ao nosso estudo, é possível que o grau de impacto aumentado em riachos mais antropizados tenham resultado em aumento excessivo na demanda energética, resultando em uma estratégia de supressão da atividade metabólica representada pela menor atividade das enzimas antioxidantes.

O aumento dos danos genotóxicos em áreas antropizadas está de acordo com a ideia de que em ambientes aquáticos mais preservados, a vegetação ripária funciona como um isolante, impedindo erosão e lixiviação dos mais diversos poluentes (VOGEL *et al.*, 2009). Por outro lado, em paisagens mais antropizadas, dada as atividades que são empregadas (por exemplo, a aplicação de agrotóxicos), a entrada de poluentes pode ser facilitada, submetendo os organismos aquáticos aos seus efeitos deletérios (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). No nosso caso, o aumento das alterações nucleares pode estar relacionado a ocorrência de contaminantes como metais não essenciais, compostos orgânicos halogenados, agroquímicos e hidrocarbonetos aromáticos

policíclicos que podem alterar a formação do fuso mitótico ou causar danos ou perda cromossômica, levando a formação de ANs e MN (VIANA *et al.*, 2018b).

A formação das ANs pode ainda ser devido alterações na proteína do citoesqueleto responsável pela manutenção da forma do núcleo (VIANA *et al.*, 2018b). Ou devido estruturas cromossômicas aberrantes geradas em células com reparo defeituoso, como cromossomos com braços longos que acabam gerando projeções nucleares conhecidas como brotos. Essas projeções durante a divisão podem ser cortadas pela placa equatorial durante a divisão celular e são consideradas precursoras dos micronúcleos (SHIMIZU *et al.*, 1998). Ainda, segundo os mesmos autores, tais anomalias nucleares podem ser decorrentes de estruturas extracromossômicas (*double-minute chromosomes*) geradas devido a falhas em processos biossintéticos, no sistema de reparo e de verificação do ciclo celular. Essas estruturas tendem a se localizar na periferia do núcleo formando também projeções na membrana nuclear até serem eliminadas por processo de micronucleação. Entretanto o processo de micronucleação pode ser interrompido, não eliminando o material extracromossômico, fazendo com que a alteração na membrana permaneça e conseqüentemente a frequência de ANs seja maior que a de MNs (SERIANI *et al.*, 2011).

Outra explicação para a menor atividade enzimática em locais com maior IPA poderia ser devido a inibição das enzimas antioxidante pela ação de metais presentes no meio aquático. Metais essenciais e não essenciais como cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn) podem ser encontrados em concentrações elevadas nos ambientes aquáticos devido a entrada de resíduos de esgoto, agrícolas e industriais. Tais metais são uma ameaça aos organismos acarretando vários efeitos negativos, como a inativação enzimática. Metais como Cu, Zn, Cd e Pb estão presentes na formulação de agrotóxicos e fertilizantes. Fe, Cu, Cr, Mn e Zn são metais essenciais para os seres vivos em pequenas concentrações, desempenhando papel no metabolismo e processos fisiológicos. Porém altas concentrações desses metais podem ser tóxicas (VIANA *et al.*, 2018a). Já o Cd e Pb são tóxicos mesmo em concentrações muito baixas (VIANA *et al.*, 2018a) e não possuem função biológica (LIMA *et al.*, 2018). Entretanto essa explicação foi descartada visto que apenas os metais Fe e Mn foram quantificados em nosso estudo e os mesmos não apresentaram mudança significativa entre o IPA. A atividade enzimática e peroxidação lipídica de tecidos de brânquias não apresentou variação ao gradiente de antropização. A possível causa para que as brânquias não tenham apresentado danos oxidativos pode ser devido a inibição da SOD por acúmulo de H₂O₂. Esse excesso pode ter ocorrido devido a ineficácia da CAT e GPx em degradar H₂O₂, esse acúmulo pode levar a geração de OH^{*} que pode causar danos oxidativos (VAN DER OOST *et*

al., 2003). Além disso a inibição da SOD provoca também o excesso de $O_2^{\bullet-}$ que pode inibir a atividade da CAT e GPx (KONO e FRIDOVICH, 1982; BLUM e FRIDOVICH, 1985). Também é possível que o que o H_2O_2 formado nas brânquias foi excretado para a água, visto que na literatura há trabalhos que demonstram a eliminação de excessos de H_2O_2 (Wilhelm-Filho *et al.*, 1994) e amônia (HEISLER, 1991) pelas brânquias. Em virtude da excreção, o H_2O_2 não apresentaria toxicidade diminuída sem participação do sistema antioxidante.

Usar as respostas biológicas em trabalhos de monitoramento é importante visto que a análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos podem apresentar deficiências em relação a real qualidade dos ambientes aquáticos. Isso se deve pois os parâmetros são avaliados de forma separada e não é levado em conta a avaliação de misturas complexas e algumas vezes determinados compostos não são detectados em concentrações relevantes ou não se conhece todos os compostos químicos presentes na amostra. Isso gera um entendimento limitado das interações químicas entre misturas químicas e o meio ambiente (LI *et al.*, 2017). Com isso, o uso de biomarcadores pode representar ferramenta para detecção de exposição e efeitos da poluição (DEUTSCHMANN *et al.*, 2016). Além disso a exposição de peixes em ambiente natural pode ser considerado uma alternativa útil entre a exposição controlado do laboratório e o monitoramento em campo com espécies selvagens, com a vantagem de capturar as mesmas flutuações de contaminantes que as espécies selvagens estão submetidas (LI *et al.*, 2017).

Em termos de biomonitoramento, a capacidade de detectar impacto de forma rápida, consistente e simples são características desejáveis de um marcador. Em nosso estudo, o fígado e sangue geraram marcadores informativos. Foram quatro marcadores que apresentaram respostas ao gradiente de antropização de forma consistente entre as estações seca e chuvosa: SOD, CAT, IBR e frequência de ANs. O IBR é um índice composto que pode ser útil quando marcadores individuais falham na detecção dos impactos.

1.5. CONCLUSÃO

O bioensaio *in vivo* utilizando peixes da espécie *A. lacustris* enjaulados em riachos permitiu detectar o gradiente de antropização da paisagem. A abordagem de múltiplos biomarcadores demonstrou-se eficiente por conseguir capturar alterações que ocorrem na paisagem ao redor dos riachos estudados. Esses efeitos foram consistentes em ambas as estações, reforçando o potencial para o uso dos marcadores citogenéticos e bioquímicos no biomonitoramento.

Agradecimentos

Os autores agradecem a disponibilização de recurso financiado por meio do convênio PROAP - UEG/CAPES (817164/2015) e pela Chamada Universal 01/2016 do CNPq (427452/2016-3). A bolsa de mestrado concedida pela Universidade Estadual de Goiás a CFCC no primeiro ano de mestrado. A bolsa de Apoio Técnico a Pesquisa concedida pelo CNPq a CFCC no seu segundo ano de mestrado. FBT agrade ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS

ACERETE, L.; BALASCH, J.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in *Eurasian perch* (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, vol. 237, p. 167–178, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.018>

ADDABBO, P.; FOCARETA, M.; MARCUCCIO, S.; VOTTO, C.; ULLO, S. L. Contribution of Sentinel-2 data for applications in vegetation monitoring. **ACTA IMEKO**, vol. 5, p. 44–54, 2016. https://doi.org/10.21014/acta_imeko.v5i2.352

ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, vol. 18, p. 779–787, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6EM00268D>

ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. **Stream ecology: structure and function of running waters**. 2007. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5583-6>

ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, vol. 104, p. 199–235, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>

BALLESTEROS, M. L.; RIVETTI, N. G.; MORILLO, D. O.; BERTRAND, L.; AMÉ, M.V.; BISTONI, M. A. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. **Science of The Total Environment**, vol. 595, p. 711–722, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.203>

BARBOSA, H. O.; BORGES, P. P.; DALA-CORTE, R. B.; MARTINS, P. T. A.; TERESA, F. B. Relative importance of local and landscape variables on fish assemblages in streams of Brazilian savanna. **Fisheries Management and Ecology**, vol. 26, p. 119–130, 2019. <https://doi.org/10.1111/fme.12331>

BAUDOU, F. G.; OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; MASTRÁNGELO, M. M.; GONZÁLEZ NÚÑEZ, A. A.; PALACIO, M. J.; FERRARI, L. Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. **Science of The Total Environment**, vol. 650, p. 1779–1786, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.342>

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 21, p. 1316–1322, 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

BEUTLER, E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 48, p. 1957–1966, 1969. <https://doi.org/10.1172/JCI106162>

BEUTLER, E. **Red cell metabolism : a manual of biochemical methods**. Grune e Stratton, New York, 1975.

BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol.240, p. 500–508, 1985. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6)

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, p. 248–254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRASIL. **Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018**. Estabelece a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Brasília, 2018.

BRASIL. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Brasília, 2005.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal - Manual de identificação**. EMBRAPA, Brasília, 1999.

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. **Canadian Journal of**

Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 47, p. 2123–2136, 1990. <https://doi.org/10.1139/f90-237>

CASATTI, L.; LANGEANI, F.; SILVA, A. M.; CASTRO, R. M. C. Stream fish, water and habitat quality in a pasture dominated basin, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 66, p. 681–696, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842006000400012>

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Índices de Qualidade das Águas. In: **Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2018**. São Paulo: CETESB, 2018. p. 1-32.

CORREDOR-SANTAMARÍA, W.; TORRES-TABARES, A.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Biochemical and histological alterations in *Aequidens metae* (Pisces, Cichlidae) and *Astyanax gr. bimaculatus* (Pisces, Characidae) as indicators of river pollution. **Science of The Total Environment**, vol. 692, p. 1234–1241, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.187>

DALZUCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; SIMÕES, L. A. R.; DE SOUZA, M. S.; PETRY, I. E.; ANDRIGUETTI, N. B.; SILVA, G. J. H.; DA SILVA, L. B.; GEHLEN, G. *In situ* monitoring of the Sinos River, southern Brazil: water quality parameters, biomarkers, and metal bioaccumulation in fish. **Environmental Science and Pollution Research**, vol.25, p. 9485–9500, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1244-7>

DEUTSCHMANN, B.; KOLAREVIC, S.; BRACK, W.; KAISAREVIC, S.; KOSTIC, J.; KRACUN-KOLAREVIC, M.; LISKA, I.; PAUNOVIC, M.; SEILER, T. B.; SHAO, Y.; SIPOS, S.; SLOBODNIK, J.; TEODOROVIC, I.; VUKOVIC-GACIC, B.; HOLLERT, H. Longitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (*Alburnus alburnus*) assessed using the comet and micronucleus assay. **Science of The Total Environment**, vol. 573, p. 1441–1449, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.175>

DEVIN, S.; BURGEOT, T.; GIAMBÉRINI, L.; MINGUEZ, L.; PAIN-DEVIN, S. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 21, p. 2448–2454, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>

DISNER, G. R.; CALADO, S. L. M.; SILVA ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. Toxicity of naphthalene in the Neotropical Fish *Astyanax Lacustris* (Characiformes: Characidae) and

Geophagus Brasiliensis (Perciformes: Cichlidae). **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, vol. 17, no. 1, p. 7–22, 2017. <https://doi.org/10.18593/eba.v17i1.12976>

FRANCISCO, C. D. M.; BERTOLINO, S. M.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. J.; MORELLI, S.; PEREIRA, B. B. Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, vol. 82, p. 514–523, 2019. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1624235>

GIMBO, R.; SAITA, M.; GONÇALVES, A.; TAKAHASHI, L. Different benzocaine concentrations on anesthetic induction in lambari (“*Astyanax altiparanae*”). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, vol. 9, p. 350–357, 2008.

GRASS Development Team, 2017. **Geographic Resources Analysis Support System (GRASS) Software**, Version 7.2. Open Source Geospatial Foundation. Electronic document. Disponível em: <http://grass.osgeo.org>

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 125, p. 189–198, 1968. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

HEISLER, N. Mode of transmembrane and transepithelial ammonia transfer. In: BICUDO, J. E. P. W. (Ed.). **The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 1-11.

JOVANOVIĆ, J.; KOLAREVIĆ, S.; MILOŠKOVIĆ, A.; RADOJKOVIĆ, N.; SIMIĆ, V.; DOJČINOVIĆ, B.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; PAUNOVIĆ, M.; KOSTIĆ, J.; SUNJOG, K.; TIMILJIĆ, J.; DJORDJEVIĆ, J.; GAČIĆ, Z.; ŽEGURA, B.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin in vitro and in situ. **Science of The Total Environment**, vol. 621, p. 1289–1299, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.099>

KARASIAK, N. **Dzetsaka Qgis Classification plugin**, 2016. Disponível em: <https://github.com/nkarasiak/dzetsaka>

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of biological chemistry**, vol. 251, p. 6183–8, 1976.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide Radical Inhibits Catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 257, p. 5751–5754, 1982.

KOSTIĆ, J.; KOLAREVIĆ, S.; KRAČUN-KOLAREVIĆ, M.; ABORGIBA, M.; GAČIĆ, Z.; PAUNOVIĆ, M.; VIŠNJIĆ-JEFTIĆ, Ž.; RAŠKOVIĆ, B.; POLEKSIĆ, V.; LENHARDT, M.; VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. **Science of The Total Environment**, vol. 601–602, p. 1670–1681, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.273>

KUBITZA, F. Boas práticas no transporte de peixes vivos. **Panorama da AQUICULTURA**, vol. 19, no. 111, p. 14–23, 2009.

LAKE, P. S. Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. **Freshwater Biology**, vol. 48, p. 1161–1172, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01086.x>

LEAL, C. G.; POMPEU, P. S.; GARDNER, T. A.; LEITÃO, R. P.; HUGHES, R. M.; KAUFMANN, P. R.; ZUANON, J.; DE PAULA, F. R.; FERRAZ, S. F. B.; THOMSON, J. R.; MAC NALLY, R.; FERREIRA, J.; BARLOW, J. Multi-scale assessment of human-induced changes to Amazonian instream habitats. **Landscape Ecology**, vol. 31, p. 1725–1745, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10980-016-0358-x>

LI, S.; VILLENEUVE, D. L.; BERNINGER, J. P.; BLACKWELL, B. R.; CAVALLIN, J. E.; HUGHES, M. N.; JENSEN, K. M.; JORGENSEN, Z.; KAHL, M. D.; SCHROEDER, A. L.; STEVENS, K. E.; THOMAS, L. M.; WEBER, M. A.; ANKLEY, G. T. An integrated approach for identifying priority contaminant in the Great Lakes Basin – Investigations in the Lower Green Bay/Fox River and Milwaukee Estuary areas of concern. **Science of The Total Environment**, vol. 579, p. 825–837, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.021>

LIMA, L. B. D.; MORAIS, P. B.; ANDRADE, R. L. T.; MATTOS, L. V.; MORON, S. E. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, vol. 237, p. 611–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.011>

NAIMAN, R. J.; DÉCAMPS, H. The ecology of interfaces: Riparian Zones. **Annual Review of Ecology and Systematics**, vol. 28, p. 621–658, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.621>

PETITJEAN, Q.; JEAN, S.; GANDAR, A.; CÔTE, J.; LAFFAILLE, P.; JACQUIN, L. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. **Science of The Total Environment**, vol. 684, p. 371–380, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>

QGIS Development Team. **QGIS Geographic Information System**, Version 3.4. Open Source Geospatial Foundation Project, 2019. Disponível em: <http://qgis.osgeo.org>

R_CORE_TEAM, 2017. **R: A language and Environment for Statistical Computing**. ([https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/)), Vienna, Austria.

RIBAS, L.; FLOS, R.; REIG, L.; MACKENZIE, S.; BARTON, B. A.; TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, vol. 269, p. 250–258, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.036>

ROCHA, M. P.; VAINI, J. O.; CRISPIM, B. D. A.; SENO, L. D. O.; OLIVERA, K. M. P.; GRISOLIA, A. B. Identification of microbiological contamination and mutagenic potential of surface waters of the municipality of Dourados, MS. **Ciência e Natura**, vol. 40, p. e38, 2018. <https://doi.org/10.5902/2179460X29423>

RStudio_Team, 2015. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, Inc.; (<http://www.rstudio.com>), Boston, MA URL.

SANTOS, L. A. C. Utilização dos dados do Cadastro Ambiental Rural na análise de conflitos de uso do solo em Áreas de Preservação Permanente. **Tecnia**, vol. 3, no. 1, p. 174–196, 2018.

SANTOS, L. A. C.; VIEIRA, L. M. F.; MARTINS, P. T. A.; FERREIRA, A. A. Conflitos de Uso e Cobertura do Solo para o Período de 1985 a 2017 na Bacia Hidrográfica do Rio CaldasGO. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, vol. 8, p. 189–211, 2019a. <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2019v8i2.p189-211>

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, Â. T.; NAPOLEÃO, S. R. Hematological characteristics, frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in peripheral of fish from São Francisco river Basin, Minas Gerais State, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, vol. 33, p. 107–112, 2011. <https://doi.org/10.4025/actasci biolsci.v33i1.7117>

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. **The Journal of Cell Biology**, vol. 140, p. 1307–1320, 1998. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1307>

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, vol. 103, no. 287–290, 1979. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81346-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81346-0)

SOKOLOVA, I. M. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. **Integrative and Comparative Biology**, vol. 53, p. 597–608, 2013. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, vol. 79, p. 1–15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>

SPOSITO, J. C. V.; FRANCISCO, L. F. V.; AMARAL CRISPIM, B.; SILVA DANTAS, F. G.; SOUZA, J. P.; VIANA, L. F.; SOLÓRZANO, J. C. J.; OLIVEIRA, K. M. P.; BARUFATTI, A. Influence of Land Use and Cover on Toxicogenetic Potential of Surface Water from Central-West Brazilian Rivers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 76, p. 483–495, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00603-2>

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: MALINS, D.C. (Ed.). **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 206. <https://doi.org/10.1201/9781351069878>

STEVANATO, D. J.; OSTRENSKY, A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, vol. 16, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170073>

TERESA, F. B.; CASATTI, L. Importância da vegetação ripária em região intensamente desmatada no sudeste do Brasil: um estudo com peixes de riacho. **Pan-american Journal of Aquatic Sciences**, vol. 5, p. 444–453, 2010.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, vol. 271, p. 69–77, 1992. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90033-I](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90033-I)

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

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; CRISPIM, B. A.; CAVALCANTE, D. N. C.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. The Response of Neotropical Fish Species (Brazil) on the Water Pollution: Metal Bioaccumulation and Genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 75, p. 476–485, 2018a. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0551-9>

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; SOLÓRZANO, J. C. J.; CRISPIM, B. A.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris* in Response to Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 75, p. 327–334, 2018b <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0476-8>

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. R. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of The Total Environment**, vol. 586, p. 598–609, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.026>

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDELLI, B.; OLIVEIRA, L. F.; COSTA CABRERA, L.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C. B. R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, vol. 542, p. 44–56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>

VOGEL, H. F.; ZAWADZKI, C. H.; METRI, R. Florestas ripárias: importância e principais ameaças. **SaBios-Revista De Saúde e Biologia**, vol. 4, p. 24–30, 2009.

WILHELM-FILHO, D.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Revista brasileira de**

pesquisas medicas e biologicas, vol. 27, p. 2879–2882, 1994.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dinâmica do uso do solo, para as mais diversas atividades antropogênicas, impõe uma série de impactos sobre os ambientes aquáticos. Com o aumento da demanda por alimentos e avanço da fronteira agrícola e pecuária, a conversão da vegetação nativa em áreas antropizadas é uma tendência preocupante. Com isso, os impactos sobre o ambiente aquático e a biodiversidade tendem a se agravar. Nessa dissertação, demonstrei que a antropização da paisagem afeta processos citogenéticos e bioquímicos, o que pode ser o início de uma cascata de efeitos que podem repercutir em escalas biológicas superiores, como populações e comunidades. Dessa forma, é possível recomendar que os marcadores citogenéticos e bioquímicos podem ser úteis como marcadores precoces do impacto da paisagem. Novos avanços a esse estudo envolveriam desvendar os mecanismos envolvidos nas respostas encontradas.

APÊNDICE A. Resultado análise do uso e cobertura da terra

Tabela A.1 – Porcentagem de uso de solo ao nível de bacia hidrográfica e *buffer* nos locais amostrais e Índice de Perturbação Antropogênica (IPA) (%).

Locais	Agricultura bacia	Pastagem bacia	Vegetação nativa bacia	Área urbana bacia	Agricultura 200 m	Pastagem 200 m	Vegetação 200 m	Área urbana 200 m	IPA
1	0.50	0.05	0.27	0.18	0.27	0.08	0.65	0.00	0.31
2	0.65	0.01	0.34	0.00	0.19	0.12	0.69	0.00	0.25
3	0.53	0.08	0.36	0.01	0.00	0.19	0.81	0.00	0.17
4	0.01	0.33	0.66	0.00	0.00	0.27	0.73	0.00	0.10
5	0.64	0.00	0.29	0.00	0.63	0.00	0.37	0.00	0.42
6	0.24	0.20	0.55	0.00	0.01	0.04	0.96	0.00	0.09
7	0.00	0.00	1.00	0.00	0.01	0.00	0.99	0.00	0.00
8	0.69	0.10	0.19	0.01	0.47	0.05	0.48	0.00	0.39
9	0.80	0.01	0.18	0.01	0.34	0.27	0.40	0.00	0.39
10	0.82	0.00	0.11	0.00	0.70	0.01	0.26	0.00	0.50
11	0.15	0.42	0.41	0.00	0.19	0.60	0.22	0.00	0.29
12	0.19	0.47	0.33	0.00	0.32	0.52	0.16	0.00	0.35
13	0.23	0.52	0.22	0.00	0.52	0.13	0.35	0.00	0.37

IPA = Índice de Perturbação Antropogênica. Quanto maior o valor do IPA, maior é a pressão antrópica indicando mais impacto no local.

APÊNDICE B. Resultado análise do uso e cobertura da terra

Tabela B.1 – Variáveis limnológicas dos locais de amostragem em comparação com a Resolução nº 357 do CONAMA e valores de IQA.

Estação	Locais	OD (% sat)	Col (NMP /100 mL)	pH (U)	DBO5 (mg/L)	N (mg/L)	P (mg/L)	Temp (°C)	Turb (NTU)	ST (mg/L)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	IQA
Seca	1	79.6	3500*	6.33	1.97	0.924	0.001	25.27	11.66	59	1.13	0.13*	59.8
	2	89.9	1700*	6.10	1.53	0.880	0.001	22.77	7.72	37	0.34	0.01	64.6
	3	86.3	490	5.86*	1.67	0.700	0.001	22.52	11.46	34	1.28	0.05	66.5
	4	85.8	61	6.41	2.46	1.510	0.001	21.58	8.63	35	0.70	0.05	74.5
	5	83.3	61	6.33	2.07	0.395	0.001	22.05	5.87	24	0.46	0.02	76.5
	6	78.2	9200*	6.22	0.99	1.050	0.001	22.15	24.81	28	0.72	0.02	57.7
	7	90.0	2200*	5.66*	3.37	0.530	0.001	21.96	7.13	6	0.09	0.00	63.0
	8	85.8	36	6.21	2.46	1.001	0.001	23.17	9.46	35	0.68	0.02	75.2
	9	84.4	92	5.73*	2.04	0.202	0.001	22.47	6.86	14	0.84	0.02	72.8
	10	86.1	140	5.63*	1.08	0.206	0.001	24.91	2.48	12	0.68	0.01	72.9
	11	83.5	140	6.38	3.35	3.031	0.001	29.54	9.42	113	4.28	0.12*	58.5
	12	85.6	82	6.38	0.46	0.503	0.001	26.23	14.41	57	0.70	0.01	73.1
	13	47.0	110	6.30	2.92	0.719	0.001	23.37	11.24	107	1.18	0.00	52.1
Chuva	1	87.3	210	6.74	1.13	0.540	0.001	25.62	31.38	63	0.05	0.25*	68.8
	2	88.1	170	6.33	1.88	0.120	0.001	23.50	27.88	39	0.78	0.02	70.3
	3	89.1	210	6.35	1.59	0.510	0.001	23.85	25.40	48	0.84	0.03	69.4
	4	86.8	92	6.60	1.28	1.500	0.001	21.99	11.24	70	0.00	0.04	71.5
	5	86.2	170	5.95*	1.35	1.550	0.001	23.26	16.30	38	1.02	0.00	69.0
	6	86.5	260	6.20	1.84	1.760	0.001	23.48	12.65	51	0.65	0.01	68.1
	7	90.9	47	6.50	1.65	2.410	0.001	25.41	11.53	33	0.28	0.00	75.9
	8	87.0	270	6.11	1.63	1.340	0.001	23.70	20.56	104	0.64	0.02	57.1
	9	76.8	140	5.35*	1.16	1.780	0.001	22.00	26.71	30	1.47	0.01	64.2
	10	88.8	330	5.33*	1.06	0.950	0.001	24.78	7.46	17	0.63	0.00	66.7
	11	77.8	140	6.17	1.92	0.350	0.007	21.51	71.70	63	0.00	0.04	63.1
	12	62.7	170	6.37	3.42	0.180	0.001	24.77	13.12	63	3.36	0.24*	64.5
	13	76.8	120	6.54	3.18	0.260	0.011	22.27	20.40	56	0.55	0.01	68.7
CONAMA		-	≤ 1,000	6 a 9	≤ 5	-	≤ 0.1	-	≤ 100	-	-	≤ 0.1	-

* valores que não atendem aos padrões especificados na Resolução CONAMA N° 357.

Valores de referência de IQA: 79 < IQA ≤ 100 = ótima; 51 < IQA ≤ 79 = boa; 36 < IQA ≤ 51 = regular; 19 < IQA ≤ 36 = ruim; IQA ≤ 19 = péssima.

OD = oxigênio dissolvido; Col = coliformes totais; pH = potencial hidrogeniônico; DBO = demanda bioquímica de oxigênio; KC = nitrogênio total; P = fósforo; Temp = temperatura; Turb = turbidez; ST = sólidos totais; Fe = ferro; Mn = manganês; IQA = Índice de Qualidade da Água.

ANEXO A. Pesos atribuído a cada parâmetro de cálculo do IQA

Parâmetros	Peso -Wi
OD	0.17
Coliformes fecais	0.15
pH	0.12
DBO5	0.1
Nitrogênio total	0.1
Fosforo total	0.1
Temperatura	0.1
Turbidez	0.08
Sólidos totais	0.08

Fonte: CETESB (2018)

ANEXO B. Equações representativas das curvas de qualidade para as variáveis propostas

Parâmetro	Limite mínimo (>)	Limite máximo (≤)	Equação de qi	
Coliformes termotolerantes (log10)	0	1	100 - 33 x logC	
	1	5	100 - 37.2 x logC + 3.60743 x log C ^2	
	5		3	
pH	0	2	2	
	2	4	13.6 - 10.6 x pH + 2.4364 x pH^2	
	4	6.2	155.5 - 77.36 x pH + 10.2481 x pH^2	
	6.2	7	-657.2 + 197.38 x pH - 12.9167 x pH^2	
	7	8	-427.8 + 142.05 x pH - 9.695 x pH^2	
	8	8.5	216 - 16 x pH	
	8.5	9	1415823 x EXP (-1.1507 x pH)	
	9	10	228 - 27 x pH	
	10	12	633 - 106.5 x pH + 4.5 x pH^2	
DBO	0	5	99.96 x EXP (-0.1232728 x C)	
	5	15	104.67 - 31.5463 x LOG10(C)	
	15	30	4394.91 x C^-1.99809	
	30		2	
Nitrogênio Total (mgN/L)	0	10	100 - 8.169 x C + 0.3059 x C^2	
	10	60	101.9 - 23.1023 x LOG10(C)	
	60	100	159.3148 x EXP (-0.0512842 x C)	
	100		1	
Fósforo (mgPO4/L)	0	1	99 x EXP (-0.91629 x C)	
	1	5	57.6 - 20.178 x C + 2.1326 x C^2	
	5	10	19.8 x EXP (-0.13544 x C)	
	10		5	
Diferença de temperatura			94 (A CETESB assume que no Brasil a temperatura dos corpos d'água são próximos da temperatura de equilíbrio. logo o valor 94 é constante)	
Turbidez (NTU)	0	25	100.17 - 2.67 x Turb + 0.03775 x Turb^2	
	25	100	84.76 x EXP (-0.016206 x Turb)	
	100		5	
Sólidos totais (mg/L)	0	150	79.75 + 0.166 x C - 0.001088 x C^2	
	150	500	101.67 - 0.13917 x C	
	500		32	
Percentagem de saturação de OD (%)	0	50	3 + 0.34 x (%sat) + 0.008095 x (%sat) ^2 + 1.35252 x 0.00001 x (%sat) ^3	
	50	85	3 - 1.166 x (%sat) + 0.058 x (%sat) ^2 - 3.803435 x 0.0001 x (%sat) ^3	
	85	100	3 + 3.7745 x (%sat) ^0.704889	
	100	140	3 - 2.9 x (%sat) - 0.02496 x (%sat) ^2 - 5.60919 x 0.00001 x (%sat) ^3	
	140		3 + 47	
	Concentração de saturação de OD (mg/L)			Cs = (14.62 - 0.3898 x temp + 0.006969 x temp^2 - 0.00005896 x temp^3) x (1 - 0.0000228675 x altitude) ^5.167
	Percentagem de saturação (%)			100 x OD/Cs

Fonte: CETESB

ANEXO C. Parecer Consubstancial do projeto de pesquisa protocolo N°. 006/2018.

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós GraduaçãoUniversidade
Estadual de GoiásESTADO
DE GOIÁSUEG-PrP
Nº FL. 40

VISTO

VISTO

Anápolis, 08 de Outubro de 2018.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PEDIDO DE EMENDA
DO PROJETO DE PESQUISA PROTOCOLO N. 006/2018**

I - Finalidade do projeto de pesquisa:
Pesquisa - Mestrado
II - Identificação:
→ Título do projeto: BIOMARCADORES DE IMPACTOS ANTRÓPICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS
→ Pesquisador Responsável/ Unidade: Fabricio Barreto Teresa; Laboratório de Biogeografia e Ecologia Aquática, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas
→ Pesquisadores Participantes: Fabricio Barreto Teresa; Carlos Filipe Camilo Cotrim; Max Miller Bicudo dos Reis; Luciana de Souza Onde; Suellem Santana Ribeiro; Filipe José Silva Xavier; Leonardo Gomes Costa
→ Unidade onde será realizado: No entorno da Floresta Nacional de Silvânia (área rural), município de Silvânia, GO
→ Data de apresentação a CEUA: 14/08/2018
→ Data de apresentação do pedido de emenda a CEUA: 16/09/2018
III - Parecer da CEUA:
<p>Informamos que a <i>Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA</i> da Universidade Estadual de Goiás, após análise, considerou APROVADO, o pedido de emenda do projeto acima referido, o qual foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, smj dessa Comissão.</p> <p>O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UEG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) após sua conclusão. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstancial, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PrP-UEG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 31/03/2020.</p>
VI - Data da reunião:
Reunião realizada no dia: 08/10/2018
Prof. Dr. Walter Dias Júnior Coordenador da CEUA/UEG