

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

CRISTIANE FUNGHETTO FUZINATTO

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM PEIXES DA ESPÉCIE
Oreochromis niloticus EXPOSTOS ÀS ÁGUAS DO RIO
CUBATÃO DO SUL/SC: ESTUDO GENOTÓXICO,
EPIGENÉTICO E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

**FLORIANÓPOLIS
2013**

CRISTIANE FUNGHETTO FUZINATTO

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM PEIXES DA ESPÉCIE
Oreochromis niloticus EXPOSTOS ÀS ÁGUAS DO RIO
CUBATÃO DO SUL/SC: ESTUDO GENOTÓXICO,
EPIGENÉTICO E DE ESTRESSE OXIDATIVO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de doutor em Engenharia Ambiental, área de concentração Toxicologia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias.**

**Florianópolis
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fuzinatto, Cristiane Funghetto
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA EM PEIXES DA ESPÉCIE *Oreochromis niloticus* EXPOSTOS ÀS ÁGUAS DO RIO CUBATÃO DO SUL/SC: ESTUDO GENOTÓXICO, EPIGENÉTICO E DE ESTRESSE OXIDATIVO / Cristiane Funghetto Fuzinatto ; orientador, William Gerson Matias - Florianópolis, SC, 2013.
149 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Rio Cubatão do Sul. 3. Genotoxicidade. 4. Epigenética. 5. Estresse Oxidativo. I. , William Gerson Matias. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. III. Título.

Folha de aprovação

*À minha família,
em especial ao
meu **AMOR** maior,
minha filha **Sophia**.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado durante esta caminhada. Por me proteger e nunca me deixar desanimar!

À minha família, por estar presente, me apoiando, aconselhando, acreditando no meu potencial e sempre incentivando. Devo minha vida a vocês!!!

Especialmente a minha filha Sophia e ao meu marido Leandro por estarem ao meu lado; por terem sacrificado inúmeras vezes seus finais de semana para me acompanharem nos trabalhos de campo e principalmente por compreenderem meus momentos de “estresse” e pela minha “ausência” mesmo estando junto. Amo vocês!!!

Ao Prof. Dr. William Gerson Matias, meu orientador, pelos conhecimentos repassados, dedicação e orientação para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adilson Pinheiro (FURB, membro da Banca Examinadora) e ao Eng. Ambiental Gustavo Antonio Piazza, mestrando da FURB, pelo valioso auxílio na elaboração do mapa de uso do solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul.

Aos demais membros da Banca Examinadora professores: Dr. Armando Borges de Castilhos Júnior (UFSC), Dra. Delmira Beatriz Wolff (UFSM), Dr. Juan Ramon Esquivel Garcia (UNISUL), Dr. Pedro Luiz Borges Chaffe (UFSC) e Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira (UNIVILLE). Suas correções e sugestões foram muito importantes para o aprimoramento deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento e suporte desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA, pela oportunidade e serviços prestados.

À equipe do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), pela amizade, convívio e auxílio durante a execução dos testes, em ordem alfabética: Ana Letícia Rossetto, Bianca Oscar, Cristina H. da Costa, Cristina M. Lalau, Denice Vicentini, José J. B. Restrepo, Letícia Flohr, Rodrigo Puerari, Marina Bortoli e Sílvia P. Melegari, muito obrigado por tudo, cada um de vocês tem um cantinho especial no meu coração!!!

À Grazieli T. Colla pelo auxílio com a manipulação dos peixinhos, e aos inúmeros colaboradores nos trabalhos de campo, vocês foram extremamente necessários para a execução deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos, pois sem vocês teria sido muito mais difícil.

*“Embora ninguém possa
voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um
novo fim.”*
(Chico Xavier)

RESUMO

A poluição aquática é considerada uma das principais preocupações ambientais nas áreas urbanas. O aumento populacional, com o crescimento desordenado da urbanização próximo às margens dos rios introduz nestes ambientes, de forma direta e indireta, diversos compostos orgânicos e inorgânicos, muitos destes com potencial genotóxico e mutagênico. Num esforço de identificar os efeitos da exposição de organismos aquáticos a estes agentes potencialmente genotóxicos, este estudo teve por objetivo verificar o potencial genotóxico e mutagênico das águas do Rio Cubatão do Sul, importante manancial de captação e distribuição de água potável para a Região da Grande Florianópolis, sobre a espécie de peixe *Oreochromis niloticus*. O Rio Cubatão do Sul foi subdividido em 4 estações amostrais, de maneira a abranger as diferentes ocupações ao longo do curso de água, onde foram coletadas amostras de água quinzenalmente para a exposição de *O. niloticus* em laboratório por 280 dias. Foram realizados testes de frequência de células micronucleadas, testes epigenéticos e de verificação do estresse oxidativo. O teste do micronúcleo foi realizado com a determinação da frequência de células micronucleadas em eritrócitos de *O. niloticus*, a verificação do estresse oxidativo foi realizada com a quantificação das taxas do malondialdeído e as alterações epigenéticas verificadas através da quantificação do percentual de 5-metilcitosina. Os resultados indicaram que as amostras de água analisadas do Rio Cubatão do Sul provocaram efeitos tóxicos durante todo o período de estudo. A elevação na frequência de micronúcleos, assim como aumentos expressivos nas taxas de malondialdeído e 5-metilcitosina demonstraram que esta mistura ambiental complexa das águas do Rio Cubatão do Sul foram capazes de ocasionar danos genotóxicos em *O. niloticus*. A genotoxicidade verificada foi atribuída às fontes não pontuais de poluição provenientes do escoamento superficial de efluentes domésticos e agrícolas sem tratamento e serve de alerta ambiental, pois o Rio Cubatão do Sul é utilizado como manancial de água para abastecimento humano.

Palavras-chave: testes de genotoxicidade, micronúcleo, lipoperoxidação, metilação do DNA, *Oreochromis niloticus*, Rio Cubatão do Sul.

ABSTRACT

Aquatic pollution is considered a major environmental concern in urban areas. The population increase, with the uncontrolled growth of urbanization near the river banks introduces, directly and indirectly, various organic and inorganic compounds, many of these with potential genotoxic and mutagenic. In an effort to identify the effects of exposure of aquatic organisms to these potentially genotoxic agents, this study aimed to verify the genotoxic and mutagenic potential of the waters of the Cubatão do Sul River, an important source of funding and distribution of drinking water for the region of Florianópolis on the fish species *Oreochromis niloticus*. The Cubatão do Sul River was divided into 4 sampling stations in order to cover the different occupations along the watercourse. The water samples were collected each 15 days, for exposure of *O. niloticus* in the laboratory for the period of 280 days. It was performed tests of frequency of micronucleated cells, epigenetic tests and the verification of oxidative stress. The micronucleus test was carried out to determine the frequency of cells with micronuclei in erythrocytes of *O. niloticus*, the verification of oxidative stress was performed with the quantification of the rates of malondialdehyde and the epigenetic alterations verified by quantifying the percentage of 5-methylcytosine. The water samples from the Cubatão do Sul River resulted in toxic effects throughout the study period. The increase in the frequency of micronuclei, as well as significant increases in rates of malondialdehyde and 5-methylcytosine demonstrated that this complex environmental mixture of water from Cubatão do Sul River was able to cause genotoxic damage in *O. niloticus*. The genotoxicity observed was attributed to non-point source pollution from runoff of agricultural and domestic effluents without treatment and serves as environmental alert because the Cubatão do Sul River is used as a source of water for human consumption.

Keywords: genotoxicity tests, micronucleus, lipid peroxidation, DNA methylation, *Oreochromis niloticus*, Cubatão do Sul River.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da sequência de respostas ao estresse causado por poluentes em um sistema biológico (adaptado de Van der Oost et al., 2003)..... 35
- Figura 2. Metilação do DNA. DNA metiltransferases (DNMTs) usam a S-adenosil-L-metionina (SAME) como a fonte de grupos metil, tornando-S-adenosil-homocisteína (SAH). DNMTs catalisam a adição de grupos metil para a posição 5 do anel de pirimidina da citosina. Fonte: Espada e Esteller, 2010. 41
- Figura 3. Modelo de geração do MDA proposto por Esterbauer et al., (1991). Fonte: Esterbauer et al., (1991). 43
- Figura 4. Localização Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul e a distribuição das estações amostrais ao longo do curso do Rio Cubatão do Sul..... 47
- Figura 5. Pontos de coleta das amostras de água no Rio Cubatão do Sul. (A) Ponto 1 – proximidades da nascente. (B) Ponto 2 – imediações do município de Águas Mornas-SC. (C) Ponto 3 – jusante do centro do município de Santo Amaro da Imperatriz-SC. (D) Ponto 4 – imediações do município de Palhoça-SC, a jusante do local de captação de água bruta para distribuição pela CASAN. 48
- Figura 6. Representação esquemática do procedimento metodológico desenvolvido durante a exposição de *O. niloticus* às amostras de água do Rio Cubatão do Sul pelo período de 280 dias..... 51
- Figura 7. Mapa de uso e ocupação do solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul – SC..... 59
- Figura 8. Distribuição temporal da média da frequência de MN (%) \pm DP, observados para a espécie de peixe *O. niloticus* expostos às amostras das águas superficiais do Rio Cubatão do Sul durante o período da Primavera 2010 – Inverno 2011. Letras iguais dentro das estações do ano indicam $p > 0,05$ 63
- Figura 9. Distribuição temporal da média da frequência de MN (%) \pm DP, observados para a espécie de peixe *O. niloticus* expostas às águas superficiais do Rio Cubatão do Sul durante o período da Primavera 2010 – Inverno 2011 considerando o Ponto 1 como local de referência. (* $p < 0,05$ indica diferença significativa entre as estações amostrais e o Ponto 1). 64
- Figura 10. Percentual da metilação do DNA ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) relacionado aos eritrócitos de *O. niloticus* expostos a mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul.

Os resultados representam a média de cada replica \pm desvio padrão. (n = 6). Letras iguais dentro das estações do ano indicam $p > 0,05$69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área das classes de uso do solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul – SC.....	60
Tabela 2. Percentual de cobertura do solo por classe de uso do solo para as sub-bacias localizadas na Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul.	60
Tabela 3. Número de eritrócitos micronucleados observados em peixes da espécie <i>Oreochromis niloticus</i> expostos às águas superficiais do Rio Cubatão do Sul durante o período de 280 dias (Primavera 2010 – Inverno 2011).	62
Tabela 4. Chuva acumulada (soma dos sete dias anteriores às coletas das amostras de água agrupadas por estação do ano) para a região do Rio Cubatão do Sul durante o período da Primavera/2010 – Inverno/2011.	64
Tabela 5. Taxas de MDA nos eritrócitos de <i>O. niloticus</i> expostos à mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul ao longo dos Pontos 1, 2, 3 e 4, controle negativo e controle positivo (Dicromato de potássio 2,5 mg/L). Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão em nM MDA/mg de proteína. * $p < 0.01$...	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE: acetilcolinesterase
ANA: Agência Nacional das Águas
BSA: albumina bovina
CASAN: Companhia Catarinense de Águas e Saneamento
CEPA: Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola
CEUA: Comitê de Ética para Uso de Animais
CIRAM: Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina/
DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DNMTs: DNA-metiltransferases
DNOCS: Departamento Nacional de Obras Contra a Seca
EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
EPAGRI: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
HNE: 4-hydroxynonenal
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
IARC: *International Agency For Research On Cancer*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LPO: lipoperoxidação
m⁵dC: 5-metilcitosina
MDA: Malondialdeído
MN: Micronúcleo
nm: nanômetro
nM: nanomolar
PBS: *Phosphate Buffered Saline* – Tampão Salino de Fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
RNA: Ácido ribonucleico
RNase A: Ribonuclease A
ROS: *Reactive Oxygen Species*
RPM: rotações por minuto
SAH: S-adenosil-homocisteína
SAmE: S-adenosil-L-metionina
SDM-FEHIDRO: Secretaria de Estado do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente - Fundo Estadual De Recursos Hídricos
SDS: Dodecilsulfato de sódio
SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

USGS: Departamento de Pesquisa Geologica dos Estados Unidos -
United States Geological Survey

UV: ultravioleta

WHO: *World Health Organization* - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Hipótese da Pesquisa.....	28
1.2 Justificativa da Pesquisa	29
CAPÍTULO II	31
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos	31
CAPÍTULO III	33
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
3.1 Bioindicadores Ambientais.....	34
3.2 Biomarcadores	34
3.3 Peixes como Indicadores Ambientais	36
3.4 Genotoxicidade Ambiental	38
3.5 Epigenética: Metilação Biológica.....	40
3.6. Estresse Oxidativo: Avaliação da Lipoperoxidação Biológica....	42
CAPÍTULO IV	45
4 METODOLOGIA	45
4.1 Área de Estudo	45
4.2 Mapa de Uso do Solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul.....	49
4.3 Organismo utilizado nos Ensaios Genotóxicos, Epigenéticos e de Estresse Oxidativo	50
4.4 Fluxograma Geral da Metodologia.....	50
4.4.1 Quantidade, transporte, aclimatação e manutenção dos peixes	51
4.4.2 Tanques e tempo de exposição crônica às águas do Rio Cubatão do Sul	52
4.5 Ensaios Genotóxicos, Epigenéticos e de Estresse Oxidativo.....	54
4.5.1 Teste do Micronúcleo.....	54
4.5.2 Metilação biológica do DNA pela quantificação do percentual de m ⁵ dC.....	55
4.5.3 Teste de Lipoperoxidação: Extração e quantificação do MDA	57
4.6 Análise Estatística.....	58
CAPÍTULO V	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Mapa de Uso Do Solo.....	59
5.2 Verificação da Frequência de Eritrócitos Micronucleados.....	61
5.3 Discussão Frequência de Eritrócitos Micronucleados.....	65

5.4	Metilação Biológica do Dna através da verificação do percentual de m ⁵ dc e os efeitos do Estresse Oxidativo com a quantificação do MDA em <i>O. Niloticus</i>	68
5.4.1	Metilação biológica do DNA através da verificação do percentual da m ⁵ dC	68
5.4.2	Verificação do estresse oxidativo através da quantificação do MDA	69
5.5	Discussão Metilação Biologica e Estresse Oxidativo.....	71
CAPÍTULO VI.....		77
6	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	77
CAPÍTULO VII		79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
CAPÍTULO VIII.....		101
8	APÊNDICES.....	101
	A1. Artigo 1	101
	A2. Dados de chuva (mm).....	123
	A3. Artigo 2	125
CAPÍTULO IX.....		147
9	ANEXOS	147
	Anexo 1 – Dados de Qualidade de Água (metais pesados, compostos orgânicos e pesticidas)	147
	Anexo 2 – Dados de Qualidade de Água (parâmetros físico-químicos e biológicos)	149

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A poluição aquática é considerada como sendo uma das principais preocupações ambientais nas áreas urbanas. A descarga de forma deliberada e/ou a liberação acidental de compostos químicos nocivos ao ambiente tem o potencial de perturbar a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas naturais (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). De acordo com o Departamento de Pesquisas Geológicas dos Estados Unidos (USGS, 2010), dados relacionando a contaminação das águas por efluentes agrícolas e domésticos são realmente preocupantes, pois compostos organoclorados, DDT e pesticidas podem ser detectados nos corpos d'água mais de 20 anos após terem sido utilizados.

Grande parte da carga genotóxica encontrada nas águas superficiais dos rios são provenientes do escoamento superficial de atividades urbanas indicando o potencial de impacto negativo da urbanização sobre a qualidade das águas superficiais (WHITE; RASMUSSEN, 1998). Compostos químicos com potencial de mutagênese estão presentes em grande variedade de misturas ambientais complexas incluindo a água potável, águas superficiais, sedimentos aquáticos, solo e atmosfera (WHITE, 2004). O ambiente aquático é o último receptor dos poluentes produzidos por fontes naturais e antrópicas, sendo que a bioacumulação e a persistência destes poluentes constituem uma ameaça para a vida biológica (FLEEGER et al., 2003). Estes fatos têm despertado o interesse em estudos de avaliação do potencial tóxico de ambientes poluídos, principalmente na avaliação de impactos de efluentes agrícolas, domésticos e industriais nas águas de rios (LEMOS; ERDTMANN, 2000; VARGAS et al., 2001; VIGANÒ et al., 2002; OHE et al., 2004; TAGLIARI et al., 2004; PANTALEÃO et al., 2006; ERGENE et al., 2007; LEMOS et al., 2007; ROCHA et al., 2009; POLARD et al., 2011a; SUMMAK et al., 2010; OMAR et al., 2012).

Os micropoluentes provenientes de efluentes agrícolas e domésticos, mesmo que em baixas concentrações, podem interagir de forma sinérgica ou antagonica, e a combinação destes efeitos pode não ser prognosticada através de análises químicas. Portanto, é fundamental a utilização de estudos toxicológicos para o entendimento destes efeitos (LAMBOLEZ et al., 1993; VAN DER OOST et al., 2003; SCHWARZENBACH et al., 2006). O entendimento dos perigos referentes aos efeitos aditivos e/ou sinérgicos dos agentes mutagênicos em ambientes complexos é bastante limitado, principalmente por não

causarem efeitos agudos, e sim efeitos crônicos que podem não ser identificados em curto prazo (SCHWARZENBACH et al., 2006).

Os efeitos crônicos são difíceis de serem avaliados, pois são detectados em longo prazo e as respostas são lentas (SCHULZE et al., 1997). O efeito crônico é resultante de uma exposição longa e de baixa intensidade do agente tóxico, que geralmente é liberado continuamente, ou com alguma periodicidade (semanas, meses ou anos), estes tóxicos podem se acumular no organismo levando a efeitos danosos (SOUZA, 2006). Algumas das consequências provocadas aos organismos pela exposição contínua aos compostos tóxicos são um dos princípios de mutações, o envelhecimento acelerado de células, a dificuldade de adaptação às mudanças ambientais e a carcinogênese (REIFFERSCHIED; GRUMMT, 2000). A genotoxicidade de misturas complexas, como a água de rios, é avaliada pela exposição de organismos vivos, que mais tarde são examinados a fim de se observar a ocorrência de danos genéticos (LAH et al., 2008).

Diversas espécies animais podem ser utilizadas como bioindicadores de genotoxicidade (CRISTALDI et al., 2004). Dentre tais, os peixes constituem-se em organismos eficientes para monitorar danos citogenéticos não apenas em laboratório, onde os agentes genotóxicos podem ser previamente conhecidos, mas também em águas superficiais ou em diferentes ecossistemas aquáticos. Estes organismos podem acumular poluentes por contaminação direta através de substâncias químicas presentes na água ou por via indireta através da ingestão de organismos que acumulam poluentes (AL-SABTI, 1995; VAN DER OOST et al., 2003; TAHERIANFARD et al., 2008), pois representam o último nível trófico na cadeia alimentar aquática e reagem de forma bastante sensível às mudanças ambientais. Os peixes respondem aos agentes genotóxicos de forma similar aos vertebrados maiores, o que permite que este organismo seja utilizado para avaliar substâncias potencialmente teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas para os humanos (FLORA et al., 1991; AL-SABTI; METCALFE, 1995; MATSUMOTO; COLUS, 2000; UDROIU, 2006; LEMOS et al., 2007). O gênero *Oreochromis* tem sido amplamente utilizado em estudos genotóxicos, epigenéticos, de estresse oxidativo e de monitoramento ambiental (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; GRISOLIA; STARLING, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; FLOHR et al., 2012; GRISOLIA et al., 2009). Os eritrócitos dos vertebrados inferiores, como peixes e anfíbios, são nucleados e sofrem divisão celular na circulação. Estas células são, portanto, adequadas para a detecção de micronúcleos que podem ser

imediatamente contados em esfregaços de sangue (CAMPANA et al., 2003), assim como também servem de matriz para a verificação de danos epigenéticos e de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é induzido por diversos compostos químicos sendo que estes contaminantes podem estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que devido a sua alta reatividade podem causar danos oxidativos a moléculas importantes de constituição e função celular, ocasionando alterações no sistema de defesa antioxidante dos organismos (HERMES-LIMA, 2004; WILHELM FILHO, 2007; LUSHCHAK, 2011; KADRY et al., 2012). A ocorrência de estresse oxidativo nos organismos aquáticos pode ser verificada através da quantificação do malondialdeído (MDA). O MDA é um biomarcador de exposição ambiental aos xenobióticos que induz a danos oxidativos, sendo um dos últimos produtos liberados no processo de lipoperoxidação, e pode ser detectado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ESTERBAUER et al., 1991; MATIAS; CREPPY, 1998a). A lipoperoxidação (LPO) é descrita como uma reação em cadeia entre o oxigênio molecular ou radicalar e os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípídios membranares. É uma reação de auto-oxidação que deteriora os lipídios polinsaturados (MATIAS; CREPPY, 1998a). A LPO é considerada a maior causadora de danos oxidativos e morte celular (HERMES-LIMA, 2004).

Alterações provocadas por xenobióticos nos sistemas periféricos, que induzem alterações das sínteses biológicas capazes de alterar a bioquímica do DNA são chamadas de epigenéticas e podem ser estudadas através da metilação do DNA (BACCARELLI; BOLLATI, 2009). Modificações epigenéticas envolvem mudanças na expressão dos genes sem alterar a sequência do DNA (ALURU et al., 2011). A metilação do DNA consiste na transferência de grupos metil de S-adenosilmetionina (SAM, um cofator enzimático presente em todas as células eucarióticas) para a posição 5 da citosina e é catalisada por enzimas conhecidas como DNA-metilase (KULIS; ESTELLER, 2010). A m⁵dC representa de 2 a 5 % de todas as citosinas presentes no genoma de mamíferos (MILLAR et al., 2003). A adição do grupo metil é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs), sendo que altos níveis de metilação estão associados à supressão dos genes o que leva à geração de deformidades e em alguns casos à mortalidade (ALURU et al., 2011). A hipermetilação do DNA envolve genes que estão diretamente relacionados à apoptose, às metástases e ao ciclo de reparo do DNA sendo reportada à inúmeros casos onde a incidência de câncer é investigada (ESTELLER et al., 2001; GRONBAEK et al., 2007).

Em relação ao litoral central do Estado de Santa Catarina (sul do Brasil) pode-se afirmar que todos os rios apresentam alguma intensidade de poluição, causada principalmente dos efluentes domésticos e industriais, resíduos sólidos, pesticidas e sedimentos (ANA, 2005). A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul é a mais preocupante tendo em vista a sua importância no abastecimento de água potável para a população desta região. De acordo com a Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN, 2013a) o Rio Cubatão do Sul, passou nos últimos anos por perdas significativas da proteção de suas margens com a supressão das matas ciliares, como consequência, isto influenciou na diminuição do volume de água do manancial ao longo dos anos. Além disso, nas margens do Rio Cubatão do Sul o cultivo expressivo de hortaliças e de gado bovino, em conjunto com a retirada da mata ciliar, despejo de esgoto doméstico, extração de areia e agricultura vem degradando tanto as margens como a qualidade e quantidade de suas águas (MARTINS et al.,1997).

De acordo com informações provenientes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a contaminação dos rios por efluentes domésticos, agrícolas e industriais tem gerado escassez na disponibilidade de água de qualidade mesmo em locais com recursos hídricos abundantes, ocasionando um aumento no custo do tratamento de água para o abastecimento humano.

Baseando-se nas informações de que os ambientes aquáticos naturais se encontram fortemente impactados, sendo potenciais receptores de diferentes poluentes, muitos com potencial tóxico, este estudo objetiva a verificação do potencial genotóxico, epigenético e de ocasionar estresse oxidativo das águas do Rio Cubatão Sul, importante manancial de captação de água para a região da Grande Florianópolis, sobre a espécie de peixe *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo).

1.1 HIPÓTESE DA PESQUISA

Com base nas informações expostas anteriormente de que as misturas ambientais complexas como as águas de rios encontram-se fortemente impactadas pelo aporte de efluentes de origem doméstica, agrícola e industrial afirma-se que esta mistura complexa pode induzir alterações no padrão genotóxico, epigenético e de estresse oxidativo dos organismos aquáticos.

1.2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

As justificativas desta pesquisa foram consolidadas nos âmbitos social/local, legal e científico.

O âmbito social/local justifica-se no fato do Rio Cubatão do Sul ser utilizado como manancial de captação de água para distribuição com água potável para uma população de aproximadamente 700.000 habitantes. A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul apresenta importância estratégica para a região da Grande Florianópolis, pois nela está localizado o principal manancial de captação de água utilizado para o abastecimento com água potável para cinco municípios desta região. A nascente do Rio Cubatão do Sul está situada no município de São Bonifácio sendo decorrente da junção de dois rios, o Rio Salto e o Rio Novo. Da nascente à foz no município de Palhoça, o Rio Cubatão do Sul percorre aproximadamente 65Km. O curso de água do Rio Cubatão do Sul apresenta diversas alterações como, a retirada da mata ciliar, a extração de areia, o lançamento de esgoto doméstico e a presença da agricultura familiar, nas regiões de entorno. Estas diferentes alterações ao longo do curso do rio afetam diretamente a qualidade de suas águas. Os processos erosivos que ocorrem nas margens do rio além de ser considerado um processo de degradação, também favorece o transporte de partículas, como por exemplo, os agrotóxicos utilizados na agricultura familiar. O Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC começou a desenvolver a área de toxicologia ambiental no ano de 1996 com a montagem do Laboratório de Toxicologia Ambiental. Desde o ano de 1997 o LABTOX atua dando suporte ao ensino, pesquisa e extensão. Esta estrutura é utilizada em estudos científicos no âmbito da identificação dos efeitos tóxicos de diferentes misturas complexas, como efluentes domésticos, resíduos sólidos, águas de lagoas e rios e nos dias atuais na pesquisa de nanocompósitos. As técnicas desenvolvidas no LABTOX permitem que sejam incluídos nos diagnósticos de qualidade ambiental variáveis a cerca dos efeitos tóxicos e genotóxicos de diferentes compostos químicos dispostos no ambiente.

O âmbito legal justifica a preocupação com a disponibilidade de água potável destinada ao abastecimento público e o direito de acesso à água potável é garantido por Lei. A Declaração dos Direitos Humanos de 1948 prevê no artigo nº 25 que toda pessoa tem direito a um nível de vida suficiente de assegurar saúde e bem-estar para si e sua família. Para assegurar este direito é imprescindível que a água destinada ao consumo

humano atenda condições mínimas para que possa ser ingerida ou utilizada para fins higiênicos. A portaria do Ministério da Saúde nº 2914/2011 dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade no artigo nº 41, § 5, indica que o plano de amostragem para os parâmetros de agrotóxicos deverá considerar a avaliação dos seus usos na bacia hidrográfica do manancial de contribuição, bem como a sazonalidade das culturas. Além disso, a Resolução nº 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, no artigo nº 8 indica que é vedado o lançamento de poluentes orgânicos persistentes e no artigo nº 18 indica que os efluentes lançados nos corpos de água não poderão causar efeitos tóxicos nos organismos aquáticos do corpo receptor.

O âmbito científico justifica a problemática de que inúmeras alterações antrópicas diminuíram a qualidade e quantidade das águas do Rio Cubatão do sul. Desta forma o rio atua como diluidor de efluentes domésticos e agrícolas. O tratamento de água convencional é ineficiente na remoção de compostos com potencial genotóxico das águas provenientes destas fontes poluidoras. Os efeitos tóxicos de compostos individuais já são conhecidos e nos últimos anos a tendência da comunidade científica é o entendimento destes efeitos sobre sistemas biológicos em misturas ambientais complexas como a água de rios. Até a finalização deste estudo não foi verificada pesquisas similares investigando os efeitos toxicológicos das águas do Rio Cubatão do Sul na ocorrência de alterações em nível de estresse oxidativo e efeitos genotóxicos e epigenéticos em organismos aquáticos. Desta forma este estudo vem contribuir para a comunidade científica por gerar uma base de dados que poderá ser utilizada para a bacia hidrográfica em questão, assim como para corpos de água em geral que sofram as mesmas intempéries.

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da mistura complexa das águas do Rio Cubatão do Sul, pertencente à Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul/Santa Catarina em causar efeitos genotóxicos, epigenéticos e de estresse oxidativo sobre peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a ocorrência de efeitos de estresse oxidativo no plasma sanguíneo de peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, através da quantificação das taxas do malondialdeído (MDA) após a exposição crônica as amostras das águas do Rio Cubatão do Sul;
- Determinar as alterações a nível genotóxico através da frequência de eritrócitos micronucleados em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* após a exposição crônica as amostras das águas do Rio Cubatão do Sul;
- Determinar as alterações a nível epigenético através da verificação da metilação biológica do DNA com a quantificação dos percentuais de m⁵dC em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, após a exposição crônica as amostras das águas do Rio Cubatão do Sul.

CAPÍTULO III

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento populacional e a crescente urbanização fizeram aumentar, nos últimos anos, o interesse da comunidade científica a respeito das consequências das ações antrópicas sobre o meio ambiente e a saúde humana. A presença de substâncias potencialmente tóxicas é uma realidade nas águas superficiais de diversos rios que são afetados diretamente com o descarte de efluentes domésticos e industriais diretamente em seu curso de água. O descarte destas substâncias com potencial genotóxico, mutagênico e até mesmo carcinogênico é um problema grave e, apesar de existir uma legislação vigente a respeito da proibição de descarte destas substâncias em ambientes naturais isto ainda ocorre (WHITE; RASMUSSEN, 1998).

Substâncias potencialmente genotóxicas presentes nas águas superficiais podem contaminar não somente os organismos aquáticos como também todo o ecossistema, podendo chegar até mesmo a afetar a saúde humana através da ingestão de organismos aquáticos pela alimentação (VON BURG; LIU, 1993).

Os agentes genotóxicos interagem com o DNA quimicamente formando adutos, promovendo alterações oxidativas ou até mesmo ocasionando quebras nas moléculas de DNA (DEARFIELD et al., 2002). As lesões geradas na grande maioria dos casos podem ser reparadas ou até mesmo eliminadas, porém, quando a lesão é fixada provoca mutações. Estas mutações podem permanecer nas células durante o processo de replicação passando a serem consideradas agentes mutagênicos (MÍDIO; MARTINS, 2000).

Com o intuito de entender os efeitos e tentar minimizar as consequências da poluição das águas sobre os ecossistemas e a saúde humana diversos programas de monitoramento ambiental vêm sendo implantados mundialmente. Grande parte destes programas se utiliza de bioindicadores e biomarcadores como ferramentas para avaliar a resposta dos organismos frente às mudanças ambientais decorrentes da poluição.

Neste capítulo serão feitas revisões sobre a utilização de bioindicadores ambientais, biomarcadores e considerações sobre toxicidade ambiental, enfatizando os efeitos genotóxicos, epigenéticos e de estresse oxidativo sobre organismos aquáticos.

3.1 BIOINDICADORES AMBIENTAIS

Um bioindicador é um organismo (ou parte de um organismo ou comunidade) que contém informações sobre a qualidade do ambiente e como estas se alteram ao longo do tempo (MARKET et al., 2003; HOLT; MILLER, 2011). Os bioindicadores ambientais possibilitam a avaliação dos efeitos das substâncias tóxicas no ambiente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde um bioindicador de toxicidade é definido como qualquer resposta biológica, no nível de indivíduo ou a nível inferior, a um ambiente químico que traduz a exposição a esse ambiente; dentro desta definição estão incluídas as alterações bioquímicas, fisiológicas, citogenéticas e também comportamentais (WHO, 1993).

No sentido ecotoxicológico um bioindicador pode ser definido como o uso de seres vivos para a verificação e avaliação dos efeitos da poluição ambiental, seja do ar, água ou solo. O efeito que determinado poluente, ou conjunto de poluentes provoca é observado no final de uma cadeia de eventos que se iniciam na emissão do poluente, seguidos pela sua dispersão no ambiente através dos fatores climáticos como vento e precipitação, que irão determinar as concentrações ambientais e terminam finalmente com os efeitos destes poluentes sobre os seres humanos, animais e plantas (KLUMPP, 2001).

Os bioindicadores permitem a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos, possibilitando a mensuração de efeitos subletais (ARIAS et al., 2007).

3.2 BIOMARCADORES

Uma das maneiras de quantificar a exposição à xenobióticos e seu potencial impacto sobre os organismos vivos, incluindo o ser humano, é a utilização de biomarcadores. O termo biomarcador é definido como sendo uma alteração produzida por xenobióticos em componentes, processos celulares, bioquímicos, estruturas ou funções que é mensurável em um sistema ou em uma amostra (HUGGETT et al., 1992).

Os biomarcadores geralmente são divididos em três categorias: biomarcadores de exposição; biomarcadores de efeito e biomarcadores de susceptibilidade. Biomarcadores de exposição são as medidas de substâncias internas dos organismos para confirmar a exposição à determinada substância ou grupo de substâncias fornecendo uma relação entre a exposição externa e a dose interna. Biomarcadores de efeito são

indicadores de uma alteração na função biológica em resposta à uma exposição química, e se relacionam diretamente com os efeitos adversos à saúde dos organismos, cujos exemplos são a quantificação da enzima acetilcolinesterase (AChE) e a quantificação do malondialdeído (MDA) (LAM et al., 2003). Biomarcadores de susceptibilidade ajudam a elucidar a variação na resposta da exposição a substâncias tóxicas observadas nos diferentes indivíduos e estão relacionados à sensibilidade dos organismos (WHO, 1993).

É frequente a utilização de biomarcadores no estudo da resposta biológica e bioquímica a contaminantes em peixes, já que estes organismos podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes aquáticos e desempenham importante papel na cadeia alimentar, pois têm a função de transportar energia de níveis tróficos inferiores para níveis superiores (BEYER et al., 1996).

Os biomarcadores refletem os efeitos biológicos adversos da exposição aos poluentes ambientais (BUCHELI; FENT, 1995). A Figura 1 apresenta a sequência de resposta ao estresse ocasionado aos organismos pela exposição a poluentes.

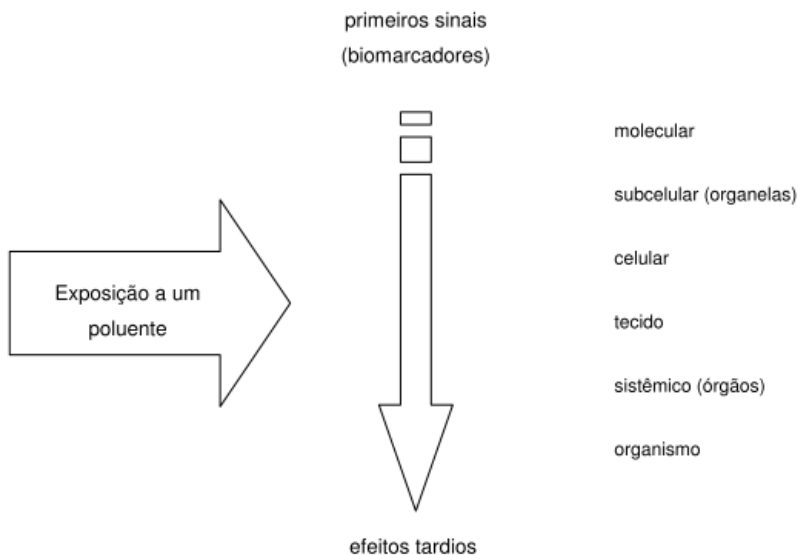


Figura 1. Representação esquemática da sequência de respostas ao estresse causado por poluentes em um sistema biológico (adaptado de Van der Oost et al., 2003).

A utilização de biomarcadores de efeito moleculares em organismos aquáticos é essencial para identificar os efeitos da ampla gama de substâncias provenientes de efluentes industriais, agrícolas e domésticos que adentram os corpos de água e exercem efeitos diretos na biota aquática (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI, 2010).

3.3 PEIXES COMO INDICADORES AMBIENTAIS

Os peixes são bioindicadores importantes para a detecção de contaminação dos recursos hídricos por substâncias potencialmente tóxicas (SUCMAN et al., 2006). Estes organismos têm sido utilizados como bioindicadores de poluição aquática por muitos anos e ocupam posição de destaque visto que o ambiente aquático é o único habitat destes organismos e no caso de ocorrência de algum acidente ambiental estes não têm possibilidade de fuga (GADZALA-KOPCIUCH et al., 2004). Lasheen et al., (2012) afirmam que os peixes podem ser considerados os bioindicadores mais significativos de poluição aquática por metais.

Peixes geralmente constituem o último elo da cadeia alimentar aquática e são diretamente afetados pelos produtores (fitoplâncton e plantas superiores), consumidores primários (zooplâncton, protozoários e pequenos crustáceos) e sua condição como topo de pirâmide alimentar reflete o estado de todo o ecossistema (GADZALA-KOPCIUCH et al., 2004), acumulando substâncias potencialmente tóxicas presentes na água de tanto de forma direta quanto indireta (MINISSI et al., 1996).

Os peixes estão expostos às substâncias tóxicas de maneira similar a outros invertebrados e podem ser utilizados para a avaliação de substâncias que tenham potencial de causar efeitos tóxicos em humanos (HARSHBARGER; CLARK, 1990). A alimentação é a principal rota para a exposição humana a substâncias tóxicas e os peixes são fonte de proteínas reconhecidas como os principais vetores destas substâncias para os seres humanos (AL-SABIT; METCALFE, 1995).

A ampla utilização dos peixes como bioindicadores deve-se ao fato deste possuírem tamanho adequado para a realização de diversos procedimentos analíticos, grande longevidade, ampla distribuição entre os níveis tróficos, facilidade de captura e manutenção laboratorial além de algumas espécies possuírem ampla distribuição geográfica (POWERS, 1989; CHOVANEC et al., 2003). Assim a espécie de peixe ideal para estudos toxicológicos deve apresentar ampla distribuição em vários ecossistemas, apresentando sensibilidade suficiente para a detecção de poluentes mesmo quando em baixas concentrações no

ambiente além de ser adequadas para a manutenção laboratorial (SÁNCHEZ-GALÁN et al., 1998).

A espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo) (Perciformes, Cichlidae) nativa de diversos países africanos, é um peixe de água doce, onívoro que foi introduzida no Brasil pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) no ano de 1971, em alguns açudes na Região Nordeste do Brasil. No ano de 1982 esta espécie foi introduzida na Região Sudeste do país (PROENÇA; BITTENCOURT, 1999).

A família Cichlidae é amplamente distribuída na África, América Central e América do Sul, Madagáscar, Israel, Síria, Sri Lanka e na costa da Índia (NELSON, 2006). Os peixes da família dos ciclídeos são modelos bastante conhecidos em estudos de biologia evolutiva devido a sua morfologia e comportamento (SEEHAUSEN, 2006; KARAKU; MEYER, 2008). O gênero *Oreochromis* consiste de 31 espécies, onde *O. niloticus* é a espécie mundialmente mais cultivada em pisciculturas (FAO, 2007). *O. niloticus* é a segunda espécie de peixe mais cultivada no país, perdendo somente para as carpas (BORGHETTI et al., 2003).

Tilápias são peixes de grande importância econômica, comumente encontradas em regiões estuarinas de todo o mundo, importantes fontes de proteínas (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003).

O gênero *Oreochromis* tem sido amplamente utilizado em estudos genotóxicos e de monitoramento ambiental (AL-SABTI; METCALFE, 1995; GRISOLIA; STARLING, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; SOUZA; FONTANETI, 2006; DEGUCHI et al., 2007; ERGENE et al., 2007; LEMOS et al., 2007; GRISOLIA et al., 2009; OMAR et al., 2012).

Omar et al., (2012) o utilizou *O. niloticus* como organismo teste para verificar o impacto da poluição aquática por metais e efluentes agrícolas em lagos contaminados no Egito, obtendo respostas positivas em relação à toxicidade do ambiente. Summak et al., (2010) ao avaliar os efeitos genotóxicos de amostras de água do Rio Nilufer (Turquia) sob o *O. niloticus* enfatizou a importância na utilização destes organismos na identificação da genotoxicidade do ambiente.

Grisolia et al., (2009) ao utilizar o *O. niloticus* para avaliar a genotoxicidade do Lago Paranoá (Brasil) observou que os peixes desta espécie apresentaram as maiores frequências de anormalidades nucleares, quando em comparação a outras espécies de peixes também utilizadas no estudo.

3.4 GENOTOXICIDADE AMBIENTAL

A genotoxicologia, conhecida também como Genética Toxicológica, ao contrário das outras disciplinas ligadas a toxicologia, não estuda somente um efeito específico adverso à saúde, mas sim avalia os efeitos genotóxicos em potencial. Esta ciência não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente utilizada como indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade avaliam efeitos iniciais ou intermediários da tumorigênese (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Estudos genéticos utilizando algumas espécies de vertebrados que foram expostos a poluentes ambientais têm demonstrado que a exposição crônica pode causar dano genético (BICKHAM et al., 2000). Portanto um fator importante a se considerar é a suscetibilidade da espécie de forma que as metodologias utilizadas para detectar o potencial genotóxico forneçam uma caracterização das áreas impactadas e os possíveis riscos para os diferentes organismos dos ecossistemas, bem como os riscos para a saúde humana (LEMOS; ERDTMANN, 2000; MAHATA et al., 2003).

Agentes genotóxicos interagem com o DNA podendo alterar sua estrutura ou função. Quando estas alterações tornam-se permanentes e podem ser transmitidas passam a ser denominadas “mutações”. As mutações são importantes fontes de variabilidade genética em uma população, porém podem ocasionar doenças dependendo da quantidade, do tipo e do local em que foram produzidas (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

Muitos estudos são desenvolvidos com o intuito de detectar os agentes genotóxicos e entender as propriedades destes agentes de forma a avaliar os efeitos hereditários ou mesmo letais aos organismos (ARNAIZ, 1995; RAGAJURU et al., 2003; LEMOS et al., 2007; BOLOGNESI et al., 2011). Desta forma a utilização de biomonitoramentos ambientais é capaz de avaliar as mudanças ocorridas no ambiente, geralmente causadas por atividades antrópicas (SILVA et al., 2003). Dentre os vários testes utilizados para a detecção de danos genotóxicos em ambientes aquáticos pode-se destacar o Teste do Micronúcleo.

O Teste do Micronúcleo (MN) é amplamente utilizado, *in vivo* e *in vitro*, para estimar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos (UDROIU, 2006). Com o Teste do MN é possível detectar agentes clastogênicos (que provocam a quebra dos cromossomos) e agentes aneugênicos (que provocam a indução da aneuploidia ou a

segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003). É um método simples, confiável, sensível e de baixo custo capaz de analisar o impacto biológico de ambientes aquáticos poluídos sobre os animais (AL-SABTI; METCALFE, 1995; RUSSO et al., 2004; UDROIU, 2006).

Micronúcleos são pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico delimitados por uma membrana independente do núcleo principal. Os micronúcleos representam o material genético perdido pelo núcleo principal formado como consequência de um dano genético que pode ter sido causado por agentes físicos, químicos ou biológicos (SILVA et al., 2003). Para que o micronúcleo seja visualizado é necessário que ocorra uma divisão celular após o evento mutagênico, sendo preciso que as células estejam se multiplicando constantemente (*in vivo*, por exemplo, medula óssea, células sanguíneas), caso contrário é preciso realizar o cultivo celular (*in vitro*) (AL-SABTI; METCALFE, 1995; RIBEIRO et al., 2003).

O Teste do Micronúcleo adaptado para a utilização em peixes foi feito por Hoffman e Raat (1982). Por apresentarem cromossomos pequenos, em grande quantidade e com baixo índice mitótico a utilização do Teste do Micronúcleo em peixes é extremamente vantajosa quando comparada a outros testes mutagênicos (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

Diferentes tipos de células podem ser empregados para a realização do Teste do MN, como brânquias, fígado, rim e sangue. As brânquias estão em contato primário com os poluentes presentes no ambiente (ARKHIPCHUCK; GARANKO, 2005), todavia o isolamento das células branquiais exige a utilização de protocolos complexos e envolve a morte do organismo. Testes realizados com o fígado dos animais apresentam limitações em relação à baixa atividade mitótica das células do fígado (WILLIAMS; METCALFE, 1992). Células renais também são usadas (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2001; RODRIGUEZ-CEA et al., 2003), e apesar de apresentarem elevada atividade mitótica (PENDAS et al., 1993) exigem que sejam empregados protocolos complexos para o isolamento celular envolvendo a morte dos organismos. Células sanguíneas são as células mais comuns utilizadas em Testes de MN. A utilização de eritrócitos periféricos evita o emprego de protocolos complexos de isolamento celular assim como também evita a morte dos organismos (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

A utilização de eritrócitos periféricos é bastante empregada e de acordo com Pretti et al., (2007) o teste consiste na coloração de esfregaços de sangue em lâminas de vidro que são posteriormente

analisadas em microscópio para a quantificação celular. Os critérios de contabilização dos MN são descritos por Carrasco et al., (1990) que definiu os micronúcleos como sendo inclusões citoplasmáticas esféricas, com contorno definido, com diâmetro entre 1/10 a 1/3 em relação ao núcleo, com coloração e com estrutura similar ao mesmo. Diferentes tipos de coloração podem ser realizados nas lâminas, sendo que a utilização de corantes fluorescentes é mais relevante para a detecção de MN pequenos (HAYASHI et al., 1990; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

O Teste do MN em eritrócitos de peixes foi amplamente validado em testes laboratoriais realizados com diferentes espécies e expostos a inúmeros agentes genotóxicos. O aumento na frequência de MN foi observado em peixes expostos à substâncias potencialmente cancerígenas como aflatoxinas (AL-SABTI; METCALFE, 1995), ciclofosfamida (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000), dicromato de potássio (PRIETO et al., 2008; ROCHA et al., 2011), pesticidas (GRISOLIA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006; ÇAVAS; KONEN, 2007; CAMPOS-VENTURA et al., 2008; ÇAVAS, 2011; POLLARD et al., 2011a), e resíduos sólidos (FLOHR, 2011; FLOHR et al., 2012). A elevação na frequência de MN também foi relatada em amostras ambientais complexas como a água de rios (FLORA et al., 1993; ANDRADE et al., 2004; PANTALEÃO et al., 2006; ERGENE et al., 2007; WIRZINGER et al., 2007).

3.5 EPIGENÉTICA: METILAÇÃO BIOLÓGICA

Epigenética é o estudo das alterações hereditárias na expressão de genes que ocorrem sem mudanças na sequência do DNA (WOLFE; MATZKE, 1999; ALURU et al., 2011). Os mecanismos epigenéticos são parâmetros genômicos flexíveis que podem alterar a função do genoma sob influência exógena (BACCARELLI; BOLLATI, 2009).

Alterações epigenéticas podem ser estudadas através da metilação do DNA. As enzimas responsáveis pela metilação do DNA são as DNA metiltransferase (DNMT). Estas enzimas utilizam S-adenosil-L-metionina (SAMe), cofator enzimático presente em todas as células eucarióticas, como o doador de grupos metil, tornando-S-adenosil homocisteína (SAH). As DNMT catalisam a adição do grupo metil para a posição 5 do anel de pirimidina da citosina (ESPADA; ESTELLER, 2010; KULIS; ESTELLER, 2010). A Figura 2 ilustra o processo de metilação do DNA.

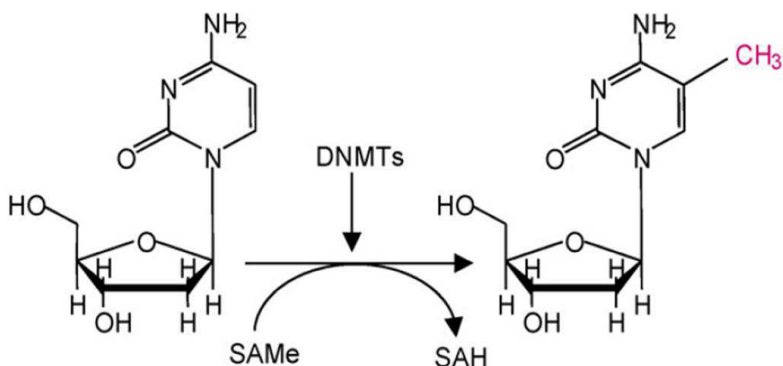


Figura 2. Metilação do DNA. DNA metiltransferases (DNMTs) usam a S-adenosil-L-metionina (SAMe) como a fonte de grupos metil, tornando-S-adenosil-homocisteína (SAH). DNMTs catalisam a adição de grupos metil para a posição 5 do anel de pirimidina da citosina. Fonte: Espada e Esteller, 2010.

A 5-metilcitosina (m^5dC) está presente no DNA de eucariontes a taxas que variam de 0,02 a 11,6% e representam de 2 a 5% de todas as citosinas presentes no genoma de mamíferos (MATIAS; CREPPY, 1998b; BIRD, 2002; MILLAR et al., 2003).

A exposição dos organismos a concentrações subletais de poluentes ambientais, como metais, pesticidas e disruptores endócrinos, mundialmente reconhecidos como cancerígenos, podem ocasionar o acúmulo de modificações epigenéticas, como a metilação do DNA (ESTELLER, 2003; BACCARELLI; BOLLATTI, 2009; WILD, 2009; COLLOTA et al., 2013).

A iniciação e progressão do câncer são causadas por profundas mudanças no padrão de metilação do DNA (SHARMA et al., 2010). A hipometilação do DNA aumenta a instabilidade genômica, ativando os oncogenes (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1984). A hipermetilação do DNA está relacionada ao silenciamento dos genes supressores de tumor (JONES; BAYLIN, 2002; 2007). Os genes supressores de tumor são envolvidos nos processos celulares que estão associados ao desenvolvimento e progressão do câncer, incluindo o ciclo de reparo do DNA e o acúmulo de lesões genéticas (SHARMA et al., 2010).

Poucos estudos investigaram o efeito da exposição a substâncias químicas e poluentes ambientais no nível de metilação de organismos aquáticos. A hipometilação foi verificada em peixes expostos a hormônios, como os peixes *Danio rerio* (STROMQVIST et al., 2010) e *Gasterosteus aculeatus* (ANIAGU et al., 2008). A hipermetilação foi

verificada em peixes expostos a metais (*Carassius auratus*, ZHOU et al., 2001), antraceno (*Danio rerio*, MIRBAHAI et al., 2011) e benzopireno (*Lepomis macrochirus*, SHUGART, (1990) e *Sebasticus marmoratus*, WANG et al., (2009)).

3.6. ESTRESSE OXIDATIVO: AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO BIOLÓGICA

O estresse oxidativo é um mecanismo conhecido de lesão celular que ocorre com o aumento da lipoperoxidação dos fosfolípidios celulares e é responsável por inúmeras disfunções celulares (CATALA, 2006). O estresse oxidativo representa uma situação de desequilíbrio, onde ocorre o aumento dos agentes oxidantes e o decréscimo dos agentes antioxidantes (BOVERIS et al., 2008).

A Lipoperoxidação (LPO) é considerada o principal mecanismo molecular envolvido em danos oxidativos a estruturas celulares e a processos de toxicidade que levam a morte celular (DIANZANI; BARRERA, 2008). O dano oxidativo é caracterizado pelo aumento nos níveis dos produtos de oxidação nas macromoléculas, como as substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Como resultado da LPO ocorre a produção de grande variedade de aldeídos, como hexanal, malondialdeído (MDA) e 4-hydroxynonenal (HNE) (CATALA, 2006).

O processo da LPO se caracteriza pelo ataque dos radicais aos ácidos graxos polinsaturados da membrana celular, provocando uma reação em cadeia com os lipoperoxídeos como produtos intermediários e produzindo modificações nas propriedades da membrana, aumentando sua permeabilidade (NAIR, 2007). Este processo pode resultar na desestabilização e desintegração da membrana celular levando o organismo a sérios problemas de saúde, desde o envelhecimento até ao câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005). Em mamíferos os produtos resultantes da LPO geralmente resultam em processos de neurotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (BOVERIS et al., 2008).

A LPO consiste em três estágios: iniciação, propagação e terminação. Uma vez iniciado, a LPO forma radicais peróxil (ROO') que podem ser rearranjados através de reação da ciclização aos endoperoxídeos (precursores do MDA) produzindo ao final do processo de peroxidação o MDA (VALKO et al., 2006) (Figura 3).

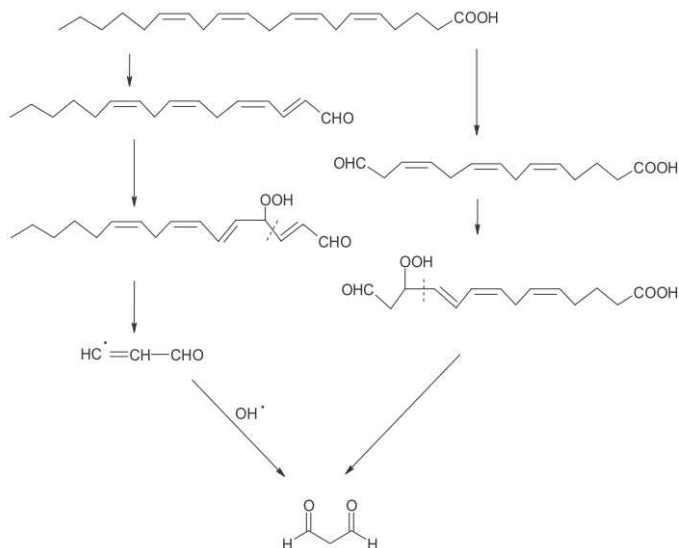


Figura 3. Modelo de geração do MDA proposto por Esterbauer et al., (1991). Fonte: Esterbauer et al., (1991).

O MDA é o produto mais importante da LPO, sendo considerado um biomarcador precoce de exposição ambiental a xenobióticos. A LPO é utilizada como bioindicador de danos oxidativos em organismos aquáticos expostos a xenobióticos como metais e poluentes orgânicos (VALAVANIDIS et al., 2006).

A quantificação do MDA tem sido utilizada como biomarcador indicativo de estresse oxidativo em peixes. *Clarias gariepinus* expostos a pesticidas em concentrações subletais apresentaram aumento significativo nas taxas de MDA (KADRY et al., 2012). O mesmo padrão foi verificado para *Danio rerio* expostos a pesticidas (LIU et al., 2008; VALAVANIDIS et al., 2006). Flohr et al., (2012) verificaram aumento nas taxas de LPO em *O. niloticus* expostos a diferentes resíduos sólidos industriais. Gravato et al., (2010) observaram elevações nas taxas de LPO em *Anguilla anguilla* que habitavam zona estuarina afetada pela poluição de pesticidas, organoclorados e disruptores endócrinos.

CAPÍTULO IV

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O Estado de Santa Catarina, de acordo com a Lei nº 10.949/98 foi dividido em dez regiões hidrográficas, sendo que a Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul pertence à Região Hidrográfica 8, denominada de RH8 – Litoral Centro. Esta região hidrográfica possui uma área total de 5.824 km² e compreende as bacias hidrográficas dos rios Tijucas, Biguaçu, Cubatão Sul e da Madre (SANTA CATARINA, 1998).

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul está situada a aproximadamente 20 km ao sul do município de Florianópolis, no Estado de Santa Catarina, localizada entre os paralelos 27°35'46" e 27°52'50" de latitude Sul e 48°38'24" e 49°02'24" de longitude Oeste. Sua área total corresponde a 738 km² dos quais 342 km² pertencem ao Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, abrangendo inteiramente os municípios de Santo Amaro da Imperatriz e Águas Mornas e parcialmente os municípios de Palhoça e São Pedro de Alcântara (SDM-FEHIDRO, 2003).

A população da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul está concentrada ao longo do curso de seu rio principal, o Cubatão do Sul sendo que os municípios de Santo Amaro da Imperatriz e Águas Mornas possuem respectivamente 75% e 42% de sua população em área urbanizada adjacente ao rio (IBGE, 2010).

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul apresenta um perímetro de 167 km e seu curso de água principal, o Rio Cubatão do Sul, da sua nascente até a foz na Baía Sul percorre 65,15 km (SDM-FEHIDRO, 2003). O Rio Cubatão Sul, tem sua nascente nas vertentes orientais das serras do Rio Novo e da Garganta, com altitudes superiores a 1.000 metros, desembocando no mar na forma de um delta ao sul do Rio Aririú, no município de Palhoça-SC (SDM-FEHIDRO, 2003). Na foz do Rio Cubatão do Sul ocorre à formação de um ecossistema de manguezal conhecido como Manguezal da Palhoça (CASAN, 2013a).

O Rio Cubatão do Sul possui vazão Q₉₀ (vazão com 90% de permanência) de 11,41 m³.s⁻¹ e vazão Q_{7,10} (vazão média de estiagem de 7 dias e 10 anos de período de retorno) de 4,75 m³.s⁻¹ (SANTA CATARINA, 2007).

As águas do Rio Cubatão do Sul foram inicialmente enquadradas pela Portaria nº 024 (SANTA CATARINA, 1979) como Água Doce

Classe 1. Esta Portaria passou por alterações pela Resolução nº 03 do Conselho Estadual dos Recursos Hídricos de Santa Catarina (CERH, 2008), sendo reclassificada como Classe Especial. A Resolução nº 03/2008 (CERH, 2008) foi revogada e atualmente as águas do Rio Cubatão do Sul são classificadas como Água Doce Classe 2 de acordo com a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

Dentre os usos do solo e da água da bacia hidrográfica destacam-se as atividades de agricultura e pecuária. Estas culturas necessitam diretamente da água para o seu cultivo e desenvolvimento e, portanto estão diretamente associadas à qualidade de água da bacia. O município de Águas Mornas foi considerado o maior produtor de produtos hortifrutigranjeiros da região da Grande Florianópolis, com destaque para a produção de tomate, mandioca, cana-de-açúcar, laranja, banana, leite e aves (SDS, 2011).

As atividades agrícolas demandam a utilização de pesticidas que por muitas vezes é feita de forma abrangente e desordenada. Assim estas substâncias fazem com que ocorra uma perda significativa na qualidade da água da bacia, o que pode trazer graves consequências à saúde da população humana, além de prejudicar de maneira rápida todo o ecossistema (GUIMARÃES, 1999).

Outro grave problema envolvendo o uso das águas do Rio Cubatão do Sul é a sua utilização como diluidora de efluentes domésticos. Esta bacia hidrográfica é afetada diretamente com o aumento populacional acelerado e a falta de tratamento adequado às águas residuárias, o que gera uma tendência de perda da qualidade das águas com consequências graves e diretas da bacia na qualidade de vida da população e do ecossistema (CHRISTIFIDIS, 2006).

O município de Santo Amaro da Imperatriz apresenta 22,5% de cobertura de esgotamento sanitário (CASAN, 2013b), já o município de Águas Mornas não apresenta uma rede de coleta e tratamento de esgoto sanitário (SDS, 2011).

Na Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul a qualidade e a quantidade de água, assim como as margens do rio estão sendo degradadas em decorrência da supressão da mata ciliar, despejo de esgoto doméstico, extração de areia e atividades agrícolas (CASAN, 2013a).

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão Sul é de importância estratégica para a Região da Grande Florianópolis, pois nela está localizado importante manancial de captação de água para o abastecimento de cinco municípios da região. Este manancial abastece

os municípios de Santo Amaro da Imperatriz, Palhoça, São José, Biguaçu e Florianópolis, atendendo a uma população de aproximadamente 700.000 habitantes. O ponto de captação de água bruta do Rio Cubatão do Sul realizado pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN) está situado à jusante do centro da cidade de Santo Amaro da Imperatriz (CASAN, 2013a).

A Figura 4 apresenta a representação esquemática de localização da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul com a distribuição espacial dos pontos de coleta das amostras de água e o local de captação de água bruta no Rio Cubatão do Sul pela CASAN.

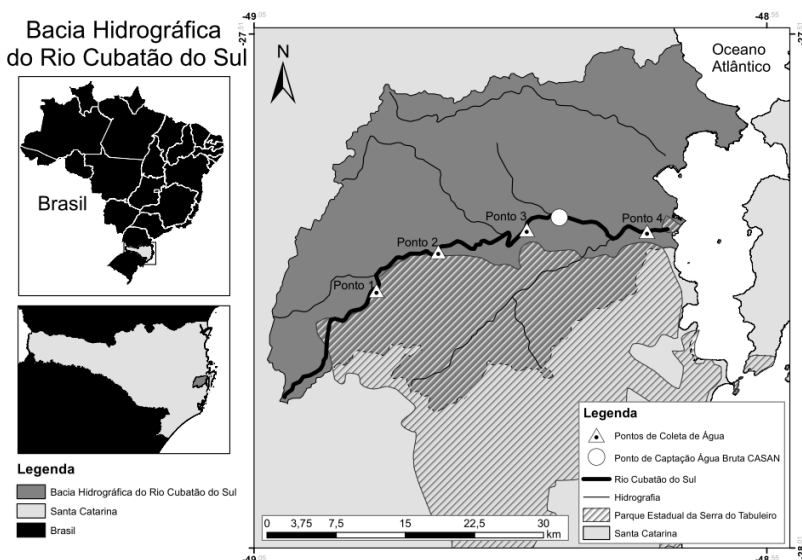


Figura 4. Localização Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul e a distribuição das estações amostrais ao longo do curso do Rio Cubatão do Sul.

O curso de água principal do Rio Cubatão do Sul foi subdividido em 4 pontos amostrais de maneira a abranger as diferentes ocupações humanas ao longo do curso do rio.

O local de coleta denominado “Ponto 1” ($27^{\circ}47'20.44''S/48^{\circ}57'37.25''W$) está localizado a aproximadamente 360 metros de altitude, próximo a nascente do Rio Cubatão do Sul, no município de São Bonifácio – SC, sendo considerado um local com pouca e/ou ausência de atividades antropogênicas.

O local de coleta denominado “Ponto 2” ($27^{\circ}43'7.46''\text{S}/48^{\circ}52'6.57''\text{W}$), localizado a aproximadamente 190 metros de altitude, está situado nas imediações do município de Águas Mornas – SC, a aproximadamente 18 km do Ponto 1.

O local de coleta denominado “Ponto 3” ($27^{\circ}42'4.15''\text{S}/48^{\circ}47'1.29''\text{W}$), localizado a aproximadamente 11 metros de altitude, está situado nas imediações do município de Santo Amaro da Imperatriz.

O local de coleta denominado “Ponto 4” ($27^{\circ}42'1.09''\text{S}/48^{\circ}39'39.87''\text{W}$), localizado a aproximadamente 2 metros de altitude, está situado nas proximidades da foz do Rio Cubatão do Sul, nas imediações da BR-101, em local que é afetado por impactos diretos da ocupação humana. Este local está situado à jusante do local onde é realizada a captação de água bruta para tratamento e distribuição pela CASAN.

A Figura 5 ilustra os pontos de coleta das amostras de água no Rio Cubatão do Sul.



Figura 5. Pontos de coleta das amostras de água no Rio Cubatão do Sul. (A) Ponto 1 – proximidades da nascente. (B) Ponto 2 – imediações do município de Águas Mornas-SC. (C) Ponto 3 – jusante do centro do município de Santo Amaro da

Imperatriz-SC. (D) Ponto 4 – imediações do município de Palhoça-SC, a jusante do local de captação de água bruta para distribuição pela CASAN.

Informações referentes aos parâmetros relacionados à qualidade das águas superficiais do Rio Cubatão do Sul foram cedidos pela CASAN. Os dados são referentes ao local de monitoramento de qualidade de água no Rio Cubatão do Sul da CASAN situado a jusante do Ponto 3 desta pesquisa, nas proximidades do local onde é realizada a captação de água bruta para tratamento e distribuição.

Os dados referentes à concentração de metais pesados, compostos orgânicos e pesticidas são apresentadas no Capítulo IX, Anexo 1 e referem-se a análise de uma amostra de água coletada em Fevereiro de 2010. Os dados referentes aos parâmetros físico-químicos e biológicos são apresentados de acordo com a média e agrupados em relação ao período de execução deste estudo (Primavera 2010 – Inverno 2011) e são apresentados no Capítulo IX, Anexo 2.

4.2 MAPA DE USO DO SOLO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO CUBATÃO DO SUL

Para melhor representação da área de estudo foi elaborado um mapa de uso e ocupação do solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul. Este mapa foi gerado no Laboratório de Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto (LABGEO) da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Para a elaboração do mapa foi utilizado uma imagem de satélite LANDSAT 5 ETM+, com data de 19 de novembro de 2010, com resolução de 30 m e sete bandas espectrais (do azul ao infravermelho afastado, sendo que a banda termal foi destacada neste estudo).

A classificação dos mapas foi feita de forma supervisionada através da interpretação visual da imagem LANDSAT. Inicialmente a imagem foi segmentada no software eCognition[®] 8 através da ferramenta multiresolution segmentation, no qual segmentos (objetos) foram gerados de acordo com a resposta espectral da imagem em relação ao uso existente em terra. Em seguida, informações foram importadas para ambiente SIG (como base cartográfica de municípios disponível no pela EPAGRI/CIRAM em escala de 1:50.000, localização geográfica das seções fluviométricas de coleta, área do parque Serra do Tabuleiro disponibilizada pela FURB e objetos gerados pelo processo de segmentação) no software ArcGIS[®] 10.1. Os objetos que foram gerados

na segmentação foram unidos (através da ferramenta merge) e em seguida foram atribuídas informações de classe para cada objeto. Apenas para fins de verificação, os polígonos formados na classificação foram conferidos com as imagens do software Google Earth, a partir da transformação dos arquivos shape (.shp) para formato Keylog Markup Language (.kml).

De maneira a identificar as diferentes áreas de influência de cada classe de uso do solo para cada Ponto de Coleta de água no Rio Cubatão do Sul foram estabelecidas, arbitrariamente, sub-bacias para cada ponto. A delimitação destas sub-bacias foi realizada em tela, sobre a base cartográfica digital utilizando o software ArcGIS®. Durante a delimitação foram respeitados a hidrografia nas áreas de entorno dos pontos de coleta de água, assim como o relevo, obtendo-se, desta forma, áreas variadas para cada ponto de coleta de água.

4.3 ORGANISMO UTILIZADO NOS ENSAIOS GENOTÓXICOS, EPIGENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

O organismo-teste escolhido foi o peixe *Oreochromis niloticus*, ou Tilápia-do-Nilo, como é popularmente conhecido. O *O. niloticus* apresenta uma série de características que o tornam um bom modelo biológico para o estudo da influência de xenobióticos em estudos toxicológicos (GADAGBUI et al., 1996).

A espécie *O. niloticus*, é excelente para a utilização em ensaios laboratoriais, devido à facilidade de adaptação a condições laboratoriais, sendo frequentemente utilizada para investigar a toxicidade de substâncias presentes nos ambientes aquáticos (ALVES-COSTA, 2001). Ainda, de acordo com Vijayan et al., (1996), *O. niloticus* é mundialmente reconhecido por sua sensibilidade e rápida resposta às alterações ambientais.

Para esta pesquisa foram utilizados exemplares de aproximadamente $31,5 \pm 0,5$ g de peso corporal e entre 11 ± 2 cm de comprimento.

4.4 FLUXOGRAMA GERAL DA METODOLOGIA

A Figura 6 apresenta uma representação esquemática da metodologia desenvolvida durante a exposição dos exemplares de *O. niloticus* as amostras da mistura complexa das águas do Rio Cubatão do Sul pelo período de 280 dias.

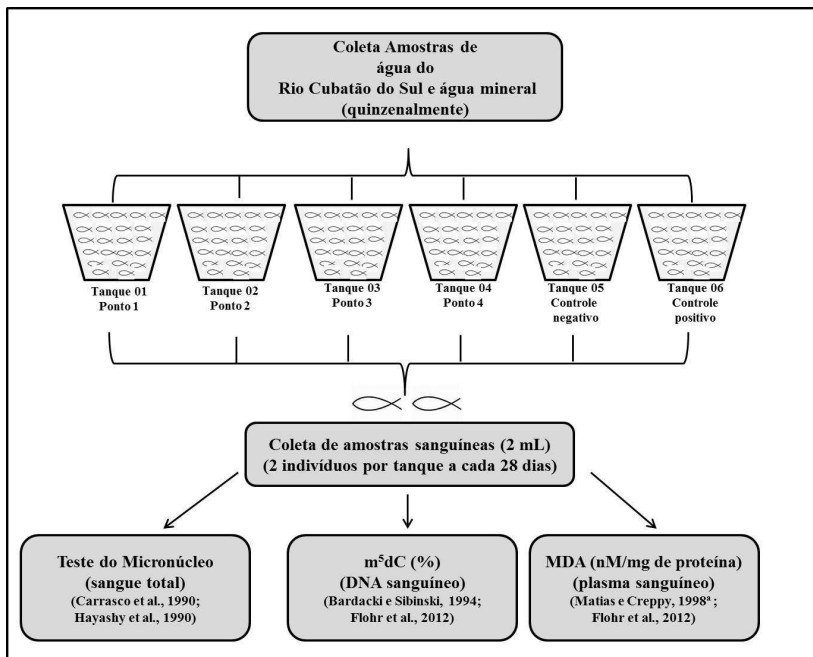


Figura 6. Representação esquemática do procedimento metodológico desenvolvido durante a exposição de *O. niloticus* às amostras de água do Rio Cubatão do Sul pelo período de 280 dias.

4.4.1 Quantidade, transporte, aclimatação e manutenção dos peixes

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), localizado no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina. Para esta pesquisa foram utilizados 132 exemplares juvenis de *O. niloticus* que foram doados pela Piscicultura Panamá, localizada no município de Paulo Lopes/SC.

O transporte dos animais da piscicultura de origem até o LABTOX foi realizado de acordo com as instruções fornecidas em manuais de piscicultura (COTRIM, 2002; SEBRAE, 2008). Os animais selecionados para a utilização neste estudo foram separados com antecedência e alimentados no dia anterior ao transporte. O transporte dos animais foi feito em sacos plásticos contendo 1/3 de água e 2/3 de oxigênio pressurizado. Estes sacos plásticos foram acondicionados em caixas de isopor e o transporte dos animais foi realizado no início da

manhã para evitar o aquecimento da água durante o traslado Piscicultura/Laboratório.

Inicialmente os animais foram aclimatados em um tanque circular de polietileno de 1.000L de capacidade, contendo água livre de cloro, com aeração constante, fotoperíodo de 16 horas de luminosidade e temperatura da água de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este tanque foi denominado de “tanque de aclimação”. A liberação dos animais no tanque de aclimação foi feita após a equalização da temperatura dos sacos plásticos contendo os animais provenientes da piscicultura, com a água do tanque de aclimação. Os sacos plásticos permaneceram em flutuação por um período mínimo de 15 minutos, de maneira a igualar a temperatura da água interna e externa. Após este período os sacos plásticos contendo os peixes foram abertos e foi acrescentada água proveniente do tanque de aclimação. Este procedimento foi realizado para que os peixes pudessem assimilar as diferenças de qualidade de água. Após este tempo os peixes foram retirados dos sacos plásticos com o auxílio de um puçá e soltos no tanque de aclimação.

Os peixes permaneceram no tanque de aclimação por 15 dias. Durante este período os peixes foram alimentados a cada 48 horas com ração para alevinos contendo 42% de proteína e 500mg/Kg de vitamina C (Peixe Juvenil, Acqua Line, Supra, RS, Brasil). O remanescente de alimento foi retirado aproximadamente 15 minutos após o fornecimento. O material fecal produzido foi removido diariamente, através de aspiração do fundo do tanque e a água foi parcialmente renovada (aproximadamente 1/3) a cada 5 dias.

4.4.2 Tanques e tempo de exposição crônica às águas do Rio Cubatão do Sul

A exposição crônica de *O. niloticus* às águas do Rio Cubatão do Sul foi realizada em tanques de polipropileno (41 x 56 x 78 cm) com capacidade para 130L de água, denominados de “tanques de exposição”. Estes tanques de exposição foram mantidos sob condições de temperatura e luminosidade similares ao tanque de aclimação, assim como a alimentação dos animais.

Foram utilizados 6 tanques de exposição equipados com um sistema de filtração completo (filtro físico e biológico Zanclus[®], modelo FBM 155). A aeração e filtração das águas do tanque de exposição foram realizadas com o auxílio de bombas com capacidade de filtração de 650L/h (SarloBetter[®], modelo Better B650).

Os tanques de exposição foram preenchidos com água proveniente dos diferentes locais de amostragem no Rio Cubatão do Sul. Cada tanque foi preenchido com 120 litros de água e estes tanques foram denominados de:

- Tanque 01: Ponto 1: água do Rio Cubatão do Sul proveniente das proximidades da nascente do Rio Cubatão do Sul;
- Tanque 02: Ponto 2: água do Rio Cubatão do Sul proveniente das proximidades do município de Águas Mornas;
- Tanque 03: Ponto 3: água do Rio Cubatão do Sul proveniente das imediações do município de Santo Amaro da Imperatriz;
- Tanque 04: Ponto 4: água do Rio Cubatão do Sul proveniente das imediações da BR-101, no município de Palhoça, porção terminal do rio;
- Tanque 05: Controle negativo: água mineral proveniente de empresa envasadora e distribuidora de água mineral situada no município de Santo Amaro da Imperatriz/SC;
- Tanque 06: Controle positivo (dicromato de potássio 2,5 mg/L): água mineral proveniente de empresa envasadora e distribuidora de água mineral situada no município de Santo Amaro da Imperatriz/SC. (Os peixes deste tanque foram expostos ao composto tóxico a cada 48h anteriores a extração sanguínea).

Após o preenchimento dos tanques com água proveniente dos diferentes locais de amostragem os peixes foram subdivididos aleatoriamente em grupos de 22 exemplares por tanque de exposição.

Foi realizada a coleta de amostras de água dos diferentes pontos e de água mineral para a renovação de aproximadamente 1/3 da água dos tanques de exposição a cada 15 dias. A limpeza do sistema de filtração (filtro físico) ocorreu semanalmente, através da substituição do perlon de seu preenchimento.

Os peixes permaneceram expostos às águas do Rio Cubatão do Sul por um período de 280 dias. A exposição dos peixes iniciou em dezembro de 2010 e foi finalizada em agosto de 2011. Durante este período foi possível abranger as diferentes mudanças ambientais decorrentes da mudança das estações do ano.

O intervalo de amostragem sanguínea dos exemplares foi de 28 dias, iniciando no 28º dia de exposição, com coletas sanguíneas subsequentes realizadas nos dias 56º, 84º, 112º, 140º, 168º, 196º, 224º, 252º e 280º de exposição às amostras de água do Rio Cubatão do Sul/SC.

A cada extração sanguínea foi coletado aleatoriamente o sangue de dois exemplares por tanque de exposição, sendo retirado

aproximadamente 2mL de sangue através de punção espinhal utilizando-se de agulhas estéreis embebidas em solução anticoagulante (0,5 mL de 0,5M EDTA pH 8,0). O sangue coletado foi imediatamente processado e aliquotado para subsequente utilização nos testes de toxicidade.

Os exemplares utilizados como controle positivo foram retirados do tanque de exposição 48h antes da extração sanguínea e acondicionados em aquários individuais com capacidade de 5L contendo uma solução de 2,5mg/L de dicromato de potássio (concentração subletal de $K_2Cr_2O_7$, adaptada ao peso do organismo, baseado em Mishra e Mohanty, 2008). Após a extração sanguínea todos os exemplares utilizados foram sacrificados através de decapitação.

Cabe aqui ressaltar que a utilização dos animais durante esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – UFSC, PP00836).

4.5 ENSAIOS GENOTÓXICOS, EPIGENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 Teste do Micronúcleo

O teste de verificação da frequência de eritrócitos micronucleados de *O. niloticus* foi realizado de acordo com Hayashi et al., (1990), com algumas modificações. Após a exposição crônica dos peixes a períodos pré-determinados foi coletado o sangue de 2 exemplares aleatórios por tanque de exposição e preparadas lâminas com esfregaços das células sanguíneas para análise microscópica.

Foram preparadas lâminas em duplicata para cada exemplar amostrado. Após a realização do esfregaço, as lâminas permaneceram secando em temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido este período iniciou-se o processo de fixação celular com a imersão das lâminas em Metanol P.A. por 10 minutos. A coloração das lâminas foi realizada no momento da análise citogenética com uma solução de Acridine Orange (1 mg/mL) e Brometo de Etídio (20µg/mL).

A análise citogenética foi realizada com a utilização de um microscópio eletrônico epi-fluorescente (Olympus® BX40) equipado com uma lente de imersão com magnificação de x1.000. O critério adotado para a identificação dos micronúcleos foi o descrito por Carrasco et al., (1990) que definiu os micronúcleos como sendo inclusões citoplasmáticas esféricas, apresentando contorno definido,

com um diâmetro entre 1/10 a 1/3 em relação ao núcleo, com coloração e estrutura similar ao mesmo.

A verificação da frequência de células micronucleadas foi realizada através de teste cego, onde pelo menos 2.000 células foram contabilizadas para cada exemplar amostrado. Somente foram contabilizadas células integras, ou seja, com membrana celular e nuclear intacta.

4.5.2 Metilação biológica do DNA pela quantificação do percentual de m⁵dC

Os procedimentos para a realização do teste de verificação da metilação biológica do DNA pela quantificação do percentual de m⁵dC foram realizados baseando-se na metodologia proposta por Flohr et al., (2012) e no protocolo de extração de DNA genômico pelo método fenol-clorofórmio adaptado de Bardacki e Sibinski (1994). A metodologia para a realização do teste foi realizada em 3 etapas descritas a seguir:

Etapa 1 - Extração, Purificação e Quantificação do DNA: Após a exposição dos peixes aos períodos pré-determinados, o sangue coletado foi acondicionado em tubos do tipo eppendorf livres de DNA e RNA com capacidade para 2mL e separado em alíquotas de 200 µL. Este procedimento foi realizado com o sangue de dois exemplares de cada tanque de exposição em triplicata. As amostras de sangue total foram centrifugadas 10 min a 2.000 RPM para a separação das hemácias e do plasma. O plasma sobrenadante foi retirado e armazenado para a utilização no ensaio de lipoperoxidação. As células decantadas foram re-suspendidas em tubos Eppendorf contendo 400µL de tampão de lise celular (1M Tris HCl pH 7,4; 1M NaCl; 0,5M EDTA pH 8; 10% SDS; Água miliQ). Logo após, foi adicionado 10µL de Proteinase K e os tubos foram submetidos à agitação vigorosa por 5 segundos. Esta mistura foi colocada para digestão em Banho-Maria, a 45°C por duas horas, realizando a homogeneização dos tubos a cada 20 minutos. Após o processo de digestão as amostras foram colocadas em recipiente contendo gelo para evitar a degradação do DNA. Após a digestão das proteínas, foi verificada a quantidade de material contido no Eppendorf e adicionando igual volume de fenol (aproximadamente 500 µL). Os tubos foram invertidos suavemente por 10 minutos, para homogeneização da mistura. Em seguida os tubos foram centrifugados a 14.000g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi retirada a fase aquosa, e transferida para um novo Eppendorf livre de DNA e

RNA. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, porém na segunda vez adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio e na terceira vez, igual volume de clorofórmio. Ao final, verificou-se a quantidade de material e adicionou-se o dobro deste volume de Isopropanol gelado (geralmente 400 μ L). Após este procedimento as amostras foram incubadas a -20°C “overnight”. Depois da incubação o material foi centrifugado a 14.000g por 30 minutos a 4°C , e o pellet formado foi lavado com 500 μ L de Etanol gelado 70% por 2 vezes, invertendo-se os tubos para lavar. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000g a 4°C , e o sobrenadante foi retirado. Após os tubos foram deixados na bancada em temperatura ambiente para secar o pellet. Depois de seco o pellet foi ressuscitado com 50 μ L de água miliQ autoclavada. Adicionou-se 5 μ L de RNase e os tubos foram deixados em bancada à temperatura ambiente “overnight” para purificação. A quantificação do DNA foi realizada através da separação de alíquotas de 4 μ L de cada amostra para a quantificação em espectrofotômetro, e o restante do DNA foi congelado a -20°C . O DNA foi quantificado por espectrometria de ultravioleta em comprimentos de onda de 260 e 280nm. Após a quantificação do DNA foi separado um volume 20 μ g de DNA purificado para a utilização na etapa seguinte.

Etapa 2 - Liofilização e Hidrólise Enzimática: Esta etapa teve por objetivo hidrolisar as proteínas e separar o DNA do RNA. 20 μ g do DNA, separados na etapa anterior, foram liofilizados em um microtubo de centrífuga durante uma noite com o auxílio de um liofilizador-centrifugador sob temperatura variável adaptado em série a uma bomba a vácuo e a um evaporador de resfriamento (MicroModulyo Freeze Dryer[®]). O DNA liofilizado foi reidratado com água ultra-pura. As amostras de DNA reidratadas foram colocadas em Banho-Maria à 100°C por 2 minutos e em seguida colocadas em banho de gelo por 15 minutos para facilitar a etapa da hidrólise. A hidrólise procedeu acrescentado a cada amostra 2 μ L de tampão acetato de potássio 250mM (pH 5,4) , 2 μ L de sulfato de zinco 10mM e 10 μ L de nuclease P1 (1U/mL). Em seguida as amostras foram incubadas à 37°C por uma noite. No dia seguinte, uma segunda hidrólise enzimática foi realizada após a adição de 4 μ L de tampão Tris-HCl 0,5M (pH 8,3) e 4 μ L de fosfatase alcalina (0,31U/mL). Foi realizada a segunda incubação pelo período de duas horas a 37°C . Após a incubação foi adicionado 25 μ L de clorofórmio para a inativação das enzimas utilizadas na hidrólise. Os tubos foram centrifugados a 13.000g por 10 minutos e a fase aquosa foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Etapa 3 - Quantificação da m⁵dC por HPLC: A quantificação da 5-metilcitosina foi efetuada por HPLC equipado com Coluna C18-fenil-nucleosil (Agilent Zorbax SB-Phenil 250 x 4.6mm, 5µm) e detector UV. Foi utilizado duas soluções, solução tampão A: 6,5 mM (NH₄) H₂PO₄ pH 3,95 filtrado através de um G5-22, Milipore (0,22 µm) e solução B: metanol a 4% (v/v) para HPLC (JT Baker®). Foi utilizado um sistema de gradiente, 0-16 min 96-4 Solução A/Solução B seguido de gradiente linear até 20% da solução B durante 32 minutos. O fluxo foi 1mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL de uma diluição 1/10 do DNA hidrolisado. O detector de ultravioleta foi utilizado com comprimento de onda em 254nm. Foram utilizadas bases padrões (dC, dT, dG, dA – Sigma Aldrich / 100 µg/mL cada) e m⁵dC (10 µg/mL) para construção da curva de calibração e quantificação.

4.5.3 Teste de Lipoperoxidação: Extração e quantificação do MDA

A metodologia utilizada para a quantificação do MDA foi realizada conforme Matias e Creppy (1998a) e Flohr et al., 2012. As amostras de sangue coletadas dos peixes após o período de exposição pré-determinado foram utilizadas para a dosagem do MDA. Inicialmente foi separada uma alíquota de 200 µL de sangue de cada indivíduo amostrado em triplicata e realizada a centrifugação por 10 minutos em 2.000 RPM. Após a centrifugação, 100µL do plasma sanguíneo foi utilizado para dar continuidade ao teste. A cada amostra de plasma sanguíneo foi adicionado 250µl de tampão SET (0,1M NaCl, 200mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8,0), e agitado vigorosamente em um Vortex. Partes do homogeneizado de plasma sanguíneo (20µL) foi retirada e congelada para posterior dosagem de proteínas pelo Método Bradford. Foram preparados oito soluções padrão de MDA com concentrações entre 7,5 e 6x10⁷ nM/mL. As amostras de plasma sanguíneo e os padrões de MDA foram tratados com 25µL de SDS 7%, 300µL de HCl 0,1 N, 40µL de ácido fosfotúngstico 1% e 300µL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Após agitação vigorosa no Vortex, os tubos foram mantidos no escuro, a 90°C, durante 1 hora, depois resfriados em gelo por 15 minutos. O complexo MDA-TBA formado foi extraído utilizando 300µL de n-butanol. Após realizou-se a centrifugação (10 minutos, a 3.000RPM), e a fase butanólica que contém o complexo MDA-TBA foi retirada e a quantificação do MDA foi realizada por HPLC-fluorescência (HP1050 HPLC System). Foi

utilizada uma coluna Suplecasil LC-18S (25cm x 4,6mm x 5µm), com injeção manual de 20 µL. A fase móvel isocrática utilizada é uma mistura de metanol:água 4:6 (v/v), pH 8,4 ajustado com KOH 0,5M, a um fluxo de 0,5mL/min. O detector de fluorescência (Programmable Fluorescence Detector HP 1064A) utilizou o comprimento de onda de excitação de 515nm e comprimento de onda de emissão de 553nm.

Para a dosagem de proteínas foi utilizado o Método de Bradford (BRADFORD, 1976). A partir dos 20 µL reservados para este fim, foram adicionado 980 µL do reativo Biorad® que foi diluído com água ultra-pura 1:4 (v/v). Esta solução foi homogeneizada e a absorbância medida a 595 nm em um espectrofotômetro CARY IE Varian – UV Visible Spectrophotometer. A concentração de proteínas nas amostras foi deduzida a partir de uma gama padrão de albumina bovina (BSA) como proteína padrão para a curva de calibração.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diferentes análises foram agrupados combinando o tempo de exposição com a estação do ano do período de análise, iniciando na primavera de 2010 e finalizando no inverno de 2011.

Para a análise estatística dos resultados obtidos em relação à frequência de MN foi utilizado o número total de alterações em cada estação do ano. Foi utilizado o Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para verificar as diferenças entre as amostras e seus respectivos controles. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

Para a análise estatística dos resultados de metilação biológica e da LPO utilizou-se a média obtida em cada estação do ano para os diferentes locais amostrados e a comparação dos dados foi realizada baseando-se no Teste de Comparações Múltiplas de Tukey para verificar as diferenças entre as amostras e seus respectivos controles. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,01$.

A análise estatística foi realizada com o software R (v2.5.1, R Core Group, 2013).

CAPÍTULO V

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MAPA DE USO DO SOLO

A classificação supervisionada permitiu a identificação de oito classes de uso e ocupação do solo para a Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul, estas classes foram: água, agricultura, pastagem, campo natural, floresta nativa, reflorestamento, restinga e urbano (Figura 7).

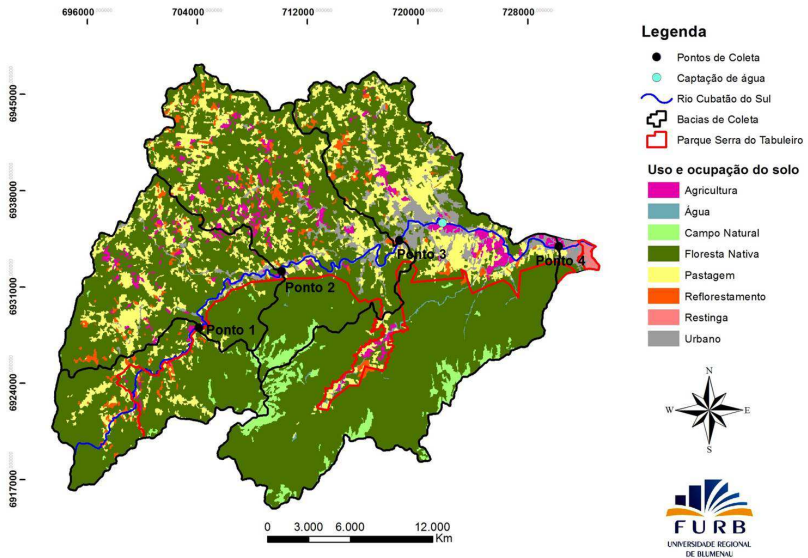


Figura 7. Mapa de uso e ocupação do solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul – SC.

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes às áreas das diferentes classes de uso e ocupação do solo.

Tabela 1. Área das classes de uso do solo da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul – SC.

Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul		
Classes de Uso do Solo	Área (km²)	%
Água	5,72	0,77
Agricultura	21,00	2,82
Pastagem	110,61	14,85
Campo Natural	21,82	2,93
Floresta Nativa	537,34	72,14
Reflorestamento	18,14	2,44
Restinga	1,87	0,25
Urbano	28,37	3,81
Total	744,86	100

Considerando somente as áreas referentes às sub-bacias delimitadas para cada ponto de coleta de amostra de água, foi determinado o percentual de cobertura do solo para cada uma das classes identificadas. A Tabela 2 apresenta as áreas em km² e porcentagem das diferentes classes de uso e ocupação do solo para cada sub-bacia.

Tabela 2. Percentual de cobertura do solo por classe de uso do solo para as sub-bacias localizadas na Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul.

Uso do Solo	Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul							
	Sub-bacias							
	Sub-bacia 1		Sub-bacia 2		Sub-bacia 3		Sub-bacia 4	
	Área (km²)	%	Área (km²)	%	Área (km²)	%	Área (km²)	%
Água	0,18	0,19	0,83	0,65	1,06	0,55	3,09	0,96
Agricultura	1,02	1,06	4,25	3,31	7,35	3,82	8,13	2,52
Pastagem	10,03	10,45	24,18	18,87	34,41	17,87	41,72	12,96
Campos Naturais	2,27	2,36	0,29	0,22	3,93	2,04	15,33	4,76
Floresta Nativa	79,23	82,59	91,95	71,75	132,94	69,05	231,60	71,91
Reflorestamento	3,08	3,21	3,49	2,72	6,41	1,60	5,16	1,60
Restinga	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Urbano	0,12	0,12	3,16	2,46	6,43	5,29	17,03	5,29
Total	95,94	100	128,14	100	192,54	100	322,06	100

De maneira geral, as sub-bacias apresentam maior percentual de uso e ocupação do solo representado pela Floresta Nativa, que representam 72,52% de sua área total. As classes de uso e ocupação do solo referentes à agricultura, pastagens e campos naturais ocupam uma área total de 20,70%, seguidas por 2,46% de sua área total referentes ao reflorestamento e 3,62% de área urbana.

5.2 VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS

Os resultados a seguir apresentados baseiam-se no primeiro artigo elaborado a partir deste estudo, que avaliou a frequência de eritrócitos micronucleados em *O. niloticus* após a exposição às águas do Rio Cubatão do Sul. O mencionado artigo intitula-se: “Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil” e foi aceito para publicação na Revista Científica “Ecotoxicology and Environmental Safety”. O artigo integral e original é apresentado no Capítulo VIII, Apêndice A1, sendo que aqui serão apresentados apenas os resultados e discussão referentes aos testes de verificação da frequência de eritrócitos micronucleados em *O. niloticus*.

Todas as amostras pertencentes ao grupo do controle negativo apresentaram uma baixa frequência de MN (0,49 – 0,90%, Tabela 3). Estas frequências de MN observadas para o controle negativo estão de acordo com os resultados obtidos em outros estudos similares (GRISOLIA; CORDEIRO, 2000; ERGENE et al., 2007, GRISOLIA et al., 2009, POLARD et al., 2011a; 2011b). Os dados obtidos na pesquisa estão ainda de acordo com nível basal encontrado para outras espécies de peixes, como pode ser verificado na revisão a respeito de estudos genotóxicos utilizando peixes realizados por Bolognesi e Hayashi (2011).

As amostras sanguíneas pertencentes ao grupo do controle positivo (dicromato de potássio 2,5 mg/L) apresentaram a maior frequência de MN verificadas no período de estudo (16,82 – 17,25%, Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com o verificado por Flohr (2011). O dicromato de potássio é conhecido por apresentar um aumento na geração de acidentes clastogênicos originando a formação de micronúcleos (NORMANN et al., 2008). Vários estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que compostos contendo Cr (VI) em sua composição são responsáveis por danos no DNA de diferentes formas, seja através de quebras de cadeia simples e dupla, aberrações cromossômicas,

formação de micronúcleos, formação de adutos no DNA além de alterações nos processos de replicação e transcrição (ZHITKOVICH et al., 1996; O'BRIEN et al., 2001; MATSUMOTO, 2003; MATSUMOTO et al., 2006; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

Tabela 3. Número de eritrócitos micronucleados observados em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* expostos às águas superficiais do Rio Cubatão do Sul durante o período de 280 dias (Primavera 2010 – Inverno 2011).

Amostra	Estação do Ano	n	Total Células	Total MN verificado	%MN ± DP
Controle Negativo	Primavera 2010	6	12219	11	0,49 ± 0,26
	Verão 2011	6	12200	6	0,90 ± 0,01
	Outono 2011	6	12091	9	0,75 ± 0,43
	Inverno 2011	6	12099	6	0,50 ± 0,25
Ponto 1	Primavera 2010	6	12245	35	2,89 ± 0,51
	Verão 2011	6	12120	58	4,74 ± 0,12
	Outono 2011	6	12093	32	2,65 ± 1,01
	Inverno 2011	6	12095	15	1,24 ± 0,75
Ponto 2	Primavera 2010	6	12143	47	3,91 ± 0,76
	Verão 2011	6	12029	75	6,18 ± 0,31
	Outono 2011	6	12116	51	4,21 ± 0,66
	Inverno 2011	6	12066	25	2,07 ± 1,25
Ponto 3	Primavera 2010	6	12231	75	6,13 ± 0,15
	Verão 2011	6	12080	100	8,28 ± 0,16
	Outono 2011	6	12077	50	4,14 ± 0,52
	Inverno 2011	6	12067	43	3,56 ± 0,29
Ponto 4	Primavera 2010	6	12059	86	7,13 ± 1,04
	Verão 2011	6	12088	118	9,76 ± 0,36
	Outono 2011	6	12068	76	6,30 ± 0,39
	Inverno 2011	6	12064	47	3,89 ± 1,26
Controle Positivo	Primavera 2010	6	12202	208	17,05 ± 0,26
	Verão 2011	6	12193	208	17,06 ± 0,55
	Outono 2011	6	12114	209	17,25 ± 0,34
	Inverno 2011	6	12068	203	16,82 ± 0,18

Verificou-se um aumento do número das células micronucleadas em direção à foz do rio (Figura 8).

Quando a frequência de micronúcleos é agrupada por local de coleta (Figura 8), praticamente todas as amostras apresentaram diferenças significativas em relação ao observado no controle negativo ($p < 0,05$), com exceção das amostras referentes ao Inverno para os Pontos 1 e 2. O Ponto 1, situado nas proximidades da nascente do Rio Cubatão do Sul (local com pouca influência antrópica) apresentou aumento significativo na frequência de MN quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$; Figura 8). Esta elevação na frequência pode ser observada de forma crescente em direção ao Ponto 4, situado nas proximidades da foz do rio.

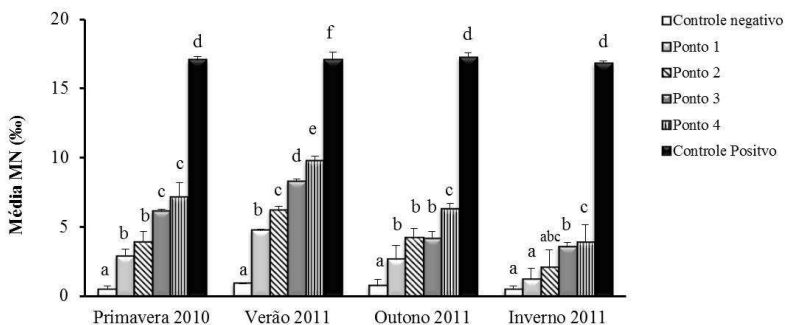


Figura 8. Distribuição temporal da média da frequência de MN (%) \pm DP, observados para a espécie de peixe *O. niloticus* expostos às amostras das águas superficiais do Rio Cubatão do Sul durante o período da Primavera 2010 – Inverno 2011. Letras iguais dentro das estações do ano indicam $p > 0,05$.

Durante o período de estudo, as maiores frequências de MN ocorreram no período do verão, para todos os locais amostrados. Estes resultados coincidem com a maior ocorrência de chuva registrada para o período, de acordo com os dados de chuva obtidos do Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina (CIRAM/EPAGRI; Tabela 4). Os dados de chuva (Tabela 4) foram agrupados conforme as estações do ano e são correspondentes a soma da chuva (mm) registrada nos sete dias anteriores as diferentes coletas das amostras de água.

Os registros dos dados de chuva acumulada (mm) referente aos 7 dias anteriores a coleta das amostras de água para os diferentes pontos

durante o período de execução da pesquisa podem ser verificados no Capítulo VIII, Apêndice A2.

Tabela 4. Chuva acumulada (soma dos sete dias anteriores às coletas das amostras de água agrupadas por estação do ano) para a região do Rio Cubatão do Sul durante o período da Primavera/2010 – Inverno/2011.

Chuva acumulada ¹ (mm)				
Estação do Ano	Pontos de Coleta			
	1	2	3	4
Primavera 2010	189,1	156,8	196,9	146,1
Verão 2011	339,0	374,6	506,0	449,5
Outono 2011	96,1	139,6	146,2	140,1
Inverno 2011	82,5	133,3	194,4	126,8

1. Chuva acumulada (soma dos 7 dias anteriores à coleta das amostras de água agrupadas por estação do ano). Fonte: Epagri – Ciram (2012).

Considerando o Ponto 1 como local de referência com pouca influência antropogênica, verificou-se que, a frequência de células micronucleadas apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para o Ponto 4 durante todo o período de estudo (Figura 9).

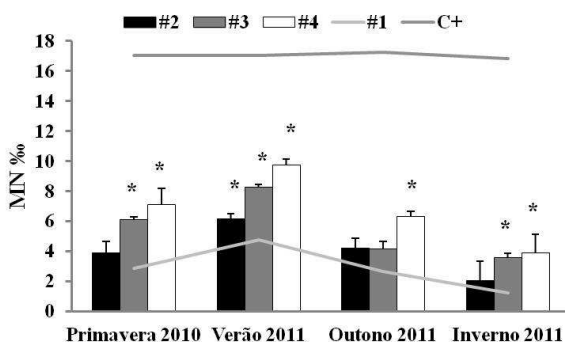


Figura 9. Distribuição temporal da média da frequência de MN (%) \pm DP, observados para a espécie de peixe *O. niloticus* expostas às águas superficiais do Rio Cubatão do Sul durante o período da Primavera 2010 – Inverno 2011 considerando o Ponto 1 como local de referência. (* $p < 0,05$ indica diferença significativa entre as estações amostrais e o Ponto 1).

5.3 DISCUSSÃO FREQUÊNCIA DE ERITRÓCITOS MICRONUCLEADOS

A verificação da frequência de MN em peixes ajuda-nos a conhecer o estado da qualidade da água, a saúde das espécies e o risco potencial destes organismos frente às diversas substâncias que podem ser encontradas no ambiente aquático (CLAXTON et al., 1998). A frequência de MN em peixes tem o potencial de detectar substâncias com atividade clastogênica no meio aquoso, sendo que os eritrócitos dos peixes demonstram grande incidência de MN após a exposição a diferentes poluentes seja em condições naturais ou através da exposição em ambiente controlado (RODRIGUEZ-CEA et al., 2003).

Considerando a distribuição espacial dos locais de estudo, verificou-se que a região banhada pelo Rio Cubatão do Sul tem forte influência do cultivo de produtos de hortifrutigranjeiros, sendo o município de Águas Mornas (proximidades do Ponto 2) considerado o maior produtor de hortifrutigranjeiros da região (PREFEITURA MUNICIPAL DE ÁGUAS MORNAS, 2013) e o município de Santo Amaro da Imperatriz (proximidades do Ponto 3) o maior produtor de tomates (cultura que exige alta frequência de aplicação de pesticidas (LATORRACA et al., 2008)) e milho da região.

Castilhos e Oliveira (2001) afirmaram que na Região da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul, 95% das propriedades agrícolas pulverizam suas culturas com pesticidas cerca de cinco vezes por semana.

As altas frequências de MN verificadas neste estudo podem ser induzidas pelos compostos químicos presentes nestes pesticidas que são aplicados para a manutenção da cultura dos vegetais e acabam sendo drenados para os corpos hídricos pelas precipitações. Estudos a respeito da toxicidade de pesticidas em peixes são escassos (SALVAGNI et al., 2011), porém alguns estudos relatam o potencial genotóxico destes agentes químicos em peixes (GRISOLIA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006; ÇAVAS; KONEN, 2007; CAMPOS-VENTURA et al., 2008; ÇAVAS, 2011).

Segundo Carneiro et al., (2012) o Brasil é o maior consumidor mundial de pesticidas, e os principais pesticidas utilizados no estado de Santa Catarina são Roundup® (Glifosato), Karate® (Lambda Cyhalothrin), Herbimix® (Atrásina e Simazina) e Priori Xtra® (Azoxyestrobina) (SALVAGNI et al., 2011).

Estudos revelam que a exposição de peixes ao glifosato aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados (GRISOLIA, 2002). *Carassius*

auratus expostos à concentração de 5 mg/Kg de glifosato durante 96 h apresentaram frequência de MN similar a observada neste estudo para a Estação Amostral 04 (ÇAVAS; KONEN, 2007).

Pesticidas à base de atrasina são frequentemente detectados em rios situados nas proximidades de áreas agrícolas (VRYZAS et al., 2011). A exposição de *O. niloticus* a uma concentração de 25 g/L de atrasina por 72 h gerou aumento na frequência de MN superior a 30x o observado no controle negativo (CAMPOS-VENTURA et al., 2008).

A porção terminal do Rio Cubatão do Sul (Ponto 4) é diretamente afetada pelos efluentes oriundos das práticas agrícolas combinados com efluentes de origem doméstica sem tratamento. Esta condição pode alterar a integridade de organismos expostos a esses contaminantes, induzindo inclusive ao aumento de frequência de MN (LE MOS et al., 2007). No entanto, os resultados positivos para a frequência de MN também podem refletir outros tipos de contribuições antrópicas difusas (LE MOS et al., 2007).

Os efluentes domésticos podem conter grandes quantidades de metais pesados como o Cu, Cd, Zn, Cr e Hg, que podem afetar o ecossistema aquático (SAMPAIO et al., 2008, ATLI et al., 2010). Os metais pesados são capazes de perturbar a integridade dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos dos peixes (ATLI; CANLI, 2008). Os danos em nível de DNA representados pela formação de micronúcleos em peixes que foram expostos a pequenas concentrações de metais são indicativos da acumulação de agentes potencialmente genotóxicos (KLIGERMAN, 1982).

O aumento da frequência de MN verificada neste estudo em direção à foz do Rio Cubatão do Sul (Ponto 4), em local com maior incidência de poluição aquática (Figura 8) é similar ao verificado por Lasheen et al., (2012) em sua pesquisa utilizando peixes como bioindicadores para a avaliação do impacto da descarga de efluentes no ambiente aquático no Egito. Condição similar também foi verificada por Hughes e Hebert (1991) ao observar a elevação na frequência de MN em trutas que habitavam locais poluídos quando comparadas a trutas que habitavam locais considerados ausentes de poluição. Bagdonas et al., (2003) detectaram elevadas frequências de MN em diferentes espécies de peixes coletados em locais poluídos do Rio Menuhas, Lituânia. Wirzinger et al., (2007) detectaram pronunciada relação entre efluentes domésticos e o nível de dano genotóxicos em *Gasterosteus aculeatus* L.

As observações anteriores permitem sugerir que a verificação da frequência de eritrócitos micronucleados é sensível para o monitoramento de poluição aquática (ALI et al., 2008, OSMAN et al.,

2011). Os danos genotóxicos observados nos eritrócitos dos peixes expostos neste estudo podem estar diretamente relacionados com os diferentes componentes das águas superficiais do Rio Cubatão do Sul, como metais, pesticidas e outros componentes inorgânicos e orgânicos desta mistura complexa.

Ao relacionarmos os dados de aumento da frequência de MN com a distribuição espacial das estações amostrais, às práticas agrícolas da região e ao escoamento superficial, percebe-se que nos períodos de menor chuva acumulada (Tabela 4) a frequência de MN foi menor em todos os locais estudados. Semanas sem chuva, ou com baixa precipitação pluvial, condição verificada no Inverno de 2011, resultam em uma diminuição do escoamento superficial resultando numa menor contaminação dos corpos de água (POLARD et al., 2011b).

Em períodos de chuvas elevada (verificado durante o Verão 2011 para toda a região banhada pelo Rio Cubatão do Sul) ocorreu um aumento do escoamento superficial e carreamento de materiais potencialmente tóxicos para as águas do rio levando a um aumento dos fatores que influenciam no processo metabólico que induzem a alteração na frequência de MN (POLARD et al., 2011b).

Galindo e Moreira (2009) verificaram uma relação entre a variação sazonal das condições climáticas e a frequência de MN constatando variações relevantes relacionando a chuva acumulada e a elevação na frequência MN. Nos meses mais chuvosos, com o aumento do escoamento superficial, impurezas foram drenadas para as águas do rio refletindo no aumento da frequência de MN.

Bresler et al., (2001) encontraram diferenças sazonais na frequência de MN sobre *Tilapia zilli* e *Cyprinus carpio* nas amostras de água do Rio Yarqon (Israel) coletadas durante a estação chuvosa. O aumento na frequência de MN foi induzido pelo escoamento superficial de lodo, resíduos sólidos urbanos e produtos químicos presentes no solo que continham compostos genotóxicos e clastogênicos. Portanto o aumento de MN observado em nosso estudo pode ser a expressão de efeitos sazonais, mas também pode estar relacionado com o escoamento superficial de áreas agrícolas.

O escoamento superficial é reconhecido como uma das principais fontes de poluentes para as águas superficiais (KAYHANIAN et al., 2007). Locais que recebem o lançamento de efluentes agrícolas e domésticos não são afetados somente pela poluição aquática, mas também pelas alterações da população aquática e consequente desenvolvimento de alterações que podem ter efeito genotóxico sob as espécies (OMAR et al., 2012).

O presente estudo evidenciou a natureza genotóxica das amostras de água do Rio Cubatão do Sul, sugerindo que as populações aquáticas locais podem estar submetidas a estresse devido às atividades agrícolas e ao despejo de efluentes domésticos. Não foram realizadas análises químicas para determinar a composição e concentração das amostras de água do rio, porque este estudo objetivou avaliar o efeito da mistura ambiental complexa das águas do rio sobre o organismo avaliado. Todavia podemos hipotetizar que os danos decorrentes do aumento da frequência de MN observados foram induzidos pelas diferentes substâncias provenientes do escoamento de resíduos de pesticidas usados na atividade agrícola e de efluentes domésticos lançados sem tratamento nas águas do Rio Cubatão do Sul, conforme dados da literatura e informações públicas da região.

5.4 METILAÇÃO BIOLÓGICA DO DNA ATRAVÉS DA VERIFICAÇÃO DO PERCENTUAL DE M⁵dC E OS EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO COM A QUANTIFICAÇÃO DO MDA EM *O. niloticus*

Os resultados apresentados neste subitem fazem parte do segundo artigo elaborado neste estudo, que avaliou a metilação biológica do DNA através da verificação do percentual de m⁵dC e os efeitos do estresse oxidativo com a quantificação do MDA em *O. niloticus* após a exposição às águas do Rio Cubatão do Sul. O mencionado artigo intitulou-se: "Effects of oxidative stress and hypermethylation induced by exposure of *Oreochromis niloticus* to complex environmental mixtures of river water of Cubatão do Sul (Santa Catarina / Brazil)" e será submetido à Revista Científica "Science of the Total Environment". O artigo original é apresentado no Capítulo 8, Apêndice A3. Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes à metilação biológica do DNA através da verificação do percentual de m⁵dC e os efeitos do estresse oxidativo com a quantificação do MDA em *O. niloticus*.

5.4.1 Metilação biológica do DNA através da verificação do percentual da m⁵dC

Após os 280 dias de exposição os peixes da espécie *O. niloticus* expostos às águas do controle negativo, produziram taxas entre 5,47-5,71% de m⁵dC. Varriale e Bernardi (2006), observaram para diversas espécies de peixes pertencentes à ordem Perciformes taxas médias de

4,00% de m^5dC , oscilando entre 2,85-5,47% de m^5dC . O dicromato de potássio (2,5 mg/L) utilizado como controle positivo produziu taxas entre 38,51-44,65 % de m^5dC , representando um aumento médio de 700% quando comparado com o controle negativo.

A quantificação da m^5dC nos eritrócitos dos peixes expostos a mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul indicaram hipermetilação significativa em todas as amostras (Figura 10). Este aumento foi observado de forma crescente em direção à foz do rio, durante todo o período de estudo. Para o Ponto 1, as taxas de m^5dC oscilaram entre $9,01 \pm 1,02\%$ (Primavera de 2010) e $17,55 \pm 2,49\%$ (Inverno de 2011) de m^5dC . O Ponto 2 apresentou taxas entre $14,18 \pm 0,49\%$ (Primavera de 2010) e $27,32 \pm 2,73\%$ (Inverno de 2011) de m^5dC . O Ponto 3 apresentou taxas entre $18,86 \pm 1,31\%$ (Primavera de 2010) e $33,16 \pm 2,60\%$ (Inverno de 2011) de m^5dC . O Ponto 4 apresentou taxas entre $24,05 \pm 5,15\%$ (Primavera de 2010) e $40,01 \pm 1,40\%$ (Inverno de 2011) de m^5dC . As condições verificadas para o final do período de estudo para o Ponto 4 são muito próximas ao verificado no controle positivo (dicromato de potássio 2,5 mg/L).

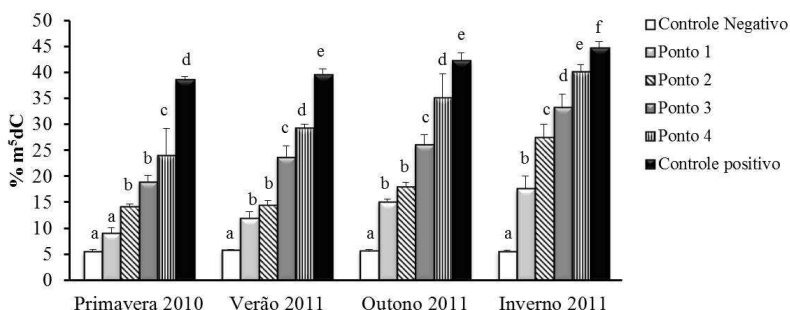


Figura 10. Percentual da metilação do DNA ($m^5dC/(m^5dC + dC) \cdot 100$) relacionado aos eritrócitos de *O. niloticus* expostos a mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul. Os resultados representam a média de cada replicação \pm desvio padrão. (n = 6). Letras iguais dentro das estações do ano indicam $p > 0,05$.

5.4.2 Verificação do estresse oxidativo através da quantificação do MDA

Para as mesmas condições de exposição, os peixes da espécie *O. niloticus* expostos às águas do controle negativo, produziram taxas médias de MDA de 11,69 nM MDA/mg de proteína. Os organismos

expostos ao controle positivo (dicromato de potássio 2,5 mg/L) apresentaram taxas médias de MDA de 109,78 nM MDA/mg de proteína (Tabela 5). Todas as taxas verificadas para o controle positivo apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,01$).

Os organismos expostos às águas superficiais do Rio Cubatão do Sul apresentaram incremento nas taxas de MDA em direção à foz do rio (montante para jusante). As taxas médias registradas foram de 21,10 nM MDA/mg de proteína para o Ponto 1, 41,71 nM MDA/mg de proteína para o Ponto 2, 55,59 nM MDA/mg de proteína para o Ponto 3 e 78,98 nM MDA/mg de proteína para o Ponto 4 (Tabela 5).

As taxas de MDA verificadas durante o período deste estudo apresentaram diferenças significativas do registrado para o controle negativo ($p < 0,01$), com exceção do registrado para o Ponto 1 durante a Primavera de 2010, Verão de 2011 e Outono de 2011.

Tabela 5. Taxas de MDA nos eritrócitos de *O. niloticus* expostos à mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul ao longo dos Pontos 1, 2, 3 e 4, controle negativo e controle positivo (Dicromato de potássio 2,5 mg/L). Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão em nM MDA/mg de proteína. * $p < 0.01$.

Amostras	n	MDA (nM MDA/mg de proteína)
Controle Negativo		
Primavera 2010	6	11,05 \pm 0,47
Verão 2011	6	12,26 \pm 0,44
Outono 2011	6	12,03 \pm 0,86
Inverno 2011	6	11,44 \pm 1,19
Ponto 1		
Primavera 2010	6	17,70 \pm 1,30
Verão 2011	6	20,18 \pm 0,87
Outono 2011	6	22,78 \pm 2,47
Inverno 2011	6	23,77 \pm 2,00 *
Ponto 2		
Primavera 2010	6	37,72 \pm 2,72 *
Verão 2011	6	34,38 \pm 4,81 *
Outono 2011	6	46,77 \pm 2,86 *
Inverno 2011	6	47,98 \pm 0,75 *
Ponto 3		
Primavera 2010	6	50,97 \pm 3,55 *
Verão 2011	6	46,35 \pm 3,35 *
Outono 2011	6	61,17 \pm 3,23 *
Inverno 2011	6	63,87 \pm 1,06 *
Ponto 4		
Primavera 2010	6	66,60 \pm 1,59 *
Verão 2011	6	65,03 \pm 1,16 *
Outono 2011	6	87,45 \pm 4,87 *
Inverno 2011	6	96,86 \pm 2,42 *
Controle Positivo		
Primavera 2010	6	107,68 \pm 1,42 *
Verão 2011	6	109,98 \pm 0,46 *
Outono 2011	6	111,06 \pm 1,23 *
Inverno 2011	6	110,41 \pm 0,69 *

5.5 DISCUSSÃO METILAÇÃO BIOLÓGICA E ESTRESSE OXIDATIVO

Misturas ambientais complexas, como a água de rios são compostas de inúmeras substâncias que podem afetar os organismos aquáticos e causar desequilíbrio ecológico. Alguns destes compostos podem ter ação tóxica sobre os organismos e, mesmo que em baixas concentrações,

podem sofrer processos aditivos, sinérgicos e/ou antagônicos que potencializam o efeito tóxico desta mistura complexa, afetando de forma negativa os organismos aquáticos (SCHWARZENBACH et al., 2006; BADERNA et al., 2011). As diferentes substâncias presentes em misturas ambientais complexas como águas de rio são capazes de gerar efeitos epigenéticos como a indução de efeitos oxidativos, além de provocar danos em nível de DNA (BACCARELLI; BOLLATI, 2009).

Os resultados obtidos nesta pesquisa para *O. niloticus* expostos às amostras das águas do Rio Cubatão do Sul indicam que esta mistura ambiental complexa induz ao aumento das taxas de MDA e a aumento nas taxas de metilação do DNA nos eritrócitos de *O. niloticus*. Os resultados mostram que as amostras coletadas induzem um aumento significativo para ambos os parâmetros, no sentido montante para jusante. Existem poucos estudos na literatura reportando efeitos de hipermetilação do DNA (quantificado pela m⁵dC), e do estresse oxidativo evidenciado pela lipoperoxidação, (quantificado pelo MDA) em eritrócitos de peixes expostos à misturas ambientais complexas como a água de rios. Alguns estudos reportam estas taxas para diferentes tipos de efluentes e substâncias como pesticidas; e órgãos e tecidos como rins, fígado e brânquias (SHUGART et al., 1990; ZHOU et al., 2001; CONTRACTOR et al., 2004; ANIAGU et al., 2008; WANG et al., 2009; JIN et al., 2010; STROMQVIST et al., 2010; MIRBAHAI et al., 2011; VELISEK et al., 2011; XING et al., 2012).

A região de influência do Rio Cubatão do Sul é bastante afetada por processos agrícolas, onde se destacam a cultura de produtos hortifrutigranjeiros (PREFEITURA MUNICIPAL DE ÁGUAS MORNAS, 2013). Estas culturas exigem alta frequência de aplicação de pesticidas (LATORRACA et al., 2008). Castilhos e Oliveira (2001) afirmaram que na Região da Bacia Hidrografia do Rio Cubatão do Sul, 95% das propriedades agrícolas pulverizam suas culturas com pesticidas cerca de cinco vezes por semana. O Brasil é o maior consumidor mundial de pesticidas (CARNEIRO et al., 2012), e os principais pesticidas utilizados no estado de Santa Catarina são glifosato (Roundup®), lambda cyhalothrin (Karate®), atrasina e simazina (Herbimix®) e azoxystrobin (Priori Xtra®) (SALVAGNI et al., 2011). Os pesticidas são conhecidos como um dos principais problemas do ambiente aquático devido à sua toxicidade, persistência e à tendência de acumulação nos organismos aquáticos (JOSEPH; RAJ, 2010). Estes compostos representam um grande perigo para a fauna aquática, especialmente para peixes, que representam considerável parte da cadeia

trófica e são uma das principais fontes de alimentos ricos em proteínas para a população (SHARMA; SINGH, 2007).

Sakuragui et al., (2013) afirmam que existe uma relação direta entre os contaminantes provenientes de práticas agrícolas e a contaminação do ambiente aquático, refletindo em danos oxidativos dos organismos aquáticos presentes neste ecossistema. Sadaukas-Henrique et al., (2011) enfatizam que a aplicação de pesticidas nas áreas agrícolas, ricos em componentes organoclorados e metais são as principais fontes de elementos tóxicos capazes de se acumularem na coluna d'água e no sedimento dos rios. O aumento das taxas de MDA para *O. niloticus* verificados ao longo do curso do Rio Cubatão do Sul podem estar relacionados com a entrada de pesticidas e outros compostos tóxicos para as águas do rio através do escoamento superficial.

Muitas classes de poluentes ambientais e/ou seus metabólitos podem causar toxicidade relacionada com estresse oxidativo, causando danos oxidativos em peixes (VELISEK et al., 2011). A exposição de animais aos pesticidas é conhecida por induzir a LPO em vários tecidos sendo responsável por efeitos biológicos adversos (Datta et al., 1992).

Kadry et al., (2012) relataram que *Clarias gariepinus* expostos ao pesticida atrasina de forma crônica apresentaram aumentos significativos nas taxas de LPO do fígado deste organismo quando comparado ao controle negativo. Jin et al., (2010) atribuíram o aumento da LPO a elevação das taxas de oxidação de ácidos graxos polinsaturados observada no fígado de *Danio rerio* expostos a 100 µg/L de atrasina (VALAVANIDIS et al, 2006; LIU et al, 2008).

Outro pesticida comumente utilizado nas culturas de produtos hortifrutigranjeiros é o glifosato, conhecido por ocasionar danos no metabolismo energético, nos processos envolvendo geração de radicais livres, na atividade da acetilcolinesterase (GLUSCZAK et al., 2006, 2007; LANGIANO; MARTINEZ, 2008). Aumentos expressivos nas taxas de MDA no músculo (GLUSCZAK et al., 2007) e fígado (MODESTO; MARTINEZ, 2010) de animais aquáticos são atribuídos ao estresse oxidativo induzido pela exposição de glifosato.

Variações na atividade das enzimas antioxidantes são indicativas de poluição ocasionada pelo estresse oxidativo (AHMAD et al., 2000, LI et al., 2003). Sharma e Singh (2004) afirmaram que o sangue atua como refletor fisiopatológico do organismo e, portanto é uma ferramenta adequada quando se deseja avaliar danos de estresse oxidativo nos organismos. No presente estudo, aumentos nas taxas de MDA nos eritrócitos dos peixes indicam que pode estar ocorrendo um distúrbio nas membranas lipídicas através da exposição de *O. niloticus* aos

pesticidas, metais e outros contaminantes presentes nesta mistura ambiental complexa que é a água do rio.

Peixes em exposição crônica a ambientes altamente poluídos, como o que pode ser verificado nas porções terminais do Rio Cubatão do Sul (Pontos 3 e 4 – Figura 4) demonstram ser incapazes de estabelecer defesas antioxidantes adequadas, provavelmente devido a danos nos hepatócitos e no sistema de defesa antioxidante, levando a danos oxidativos (SAKURAGUI et al., 2013).

As taxas crescentes de MDA verificadas nesta pesquisa denotam a natureza cumulativa destes efeitos de toxicidade crônica e demonstraram ser importante ferramenta na avaliação do estresse oxidativo de *O. niloticus* após exposição às amostras das águas do Rio Cubatão do Sul.

Este estudo também demonstrou que a taxa de metilação do DNA de *O. niloticus* é afetada pela exposição crônica dos peixes a água do Rio Cubatão do Sul. Em nosso estudo, a hipermetilação do DNA foi observada de forma crescente ao longo do curso de água do rio, e demonstrou ter efeito cumulativo, atingindo picos correspondentes ao verificado no controle positivo para o percentual de m⁵dC na porção terminal do rio (Ponto 4) no final do período de estudo (Inverno de 2011).

A contaminação das águas do Rio Cubatão do Sul pela ocupação humana de suas margens, com o lançamento de efluentes domésticos sem tratamento, escoamento superficial proveniente de áreas agrícolas e outras fontes não pontuais de poluição, leva para o ambiente aquático metais, pesticidas, compostos organoclorados e outras substâncias tóxicas que podem estar relacionadas com mudanças no padrão epigenético de *O. niloticus*.

Em uma revisão recente sobre efeitos epigenéticos de pesticidas (COLLOTA et al., 2013), não foram encontrados estudos referindo-se a percentuais de metilação biológica do DNA em peixes. Baccarelli e Bollati (2009) afirmaram que inúmeras classes de poluentes ambientais são capazes de ocasionar danos epigenéticos. Dentre estes poluentes, podemos citar os metais, os pesticidas e os compostos organoclorados.

Li et al., (2009) observaram a hipermetilação do DNA em embriões de *Danio rerio* expostos ao arsênio (2 mM) após 48h de exposição. Diferentes metais, como o arsênio são reconhecidos internacionalmente como agentes potencialmente cancerígenos e podem estar presente em solos e fazer parte da composição de pesticidas, podendo ser carregados para a água dos rios com o escoamento superficial (SABO-ATTWOOD et al., 2006).

É possível relacionar os resultados observados em *O. niloticus* após a exposição à mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul na porção terminal (Ponto 4 – Figura 4) com os resultados observados no controle positivo (Figura 10). Os organismos expostos a estas amostras (Ponto 4 – Inverno 2011) apresentaram percentuais de m⁵dC similar aos organismos expostos a 2,5mg/L de dicromato de potássio. O cromo é um dos metais mais pesquisados a respeito de suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (IARC, 1990). Kondo et al., (2006) demonstraram que a exposição a compostos contendo cromo em sua composição influenciam nos processos que levam a hipermetilação. Labra et al., (2004) verificaram que a hipermetilação do DNA pode estar relacionada à exposição ao cromo produzindo variações em um ou mais resíduos de citosina, tornando a hipermetilação do DNA mais frequente que a hipometilação do DNA. Apesar de metais como o cromo possuírem seu próprio mecanismo de ação, acredita-se que nestes processos estejam envolvidas ROS que podem levar a alterações epigenéticas de metilação do DNA, sem ocasionar mutações das bases do DNA (O'BRIEN et al., 2003).

O estresse oxidativo pode ocasionar danos no DNA, causando alteração na metilação, o que pode levar a carcinogese (TRAORE et al., 2000). Com o conhecimento de que os diferentes compostos presentes na água do Rio Cubatão do Sul, como metais, pesticidas, organoclorados levam a LPO através do estresse oxidativo, ocasionando mutações no DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2005) é possível relacionar os resultados de aumento da LPO e da hipermetilação do DNA induzido em *O. niloticus* após a exposição crônica a mistura ambiental complexa das amostras das águas do Rio Cubatão do Sul. Sabendo-se que o Rio Cubatão do Sul é um importante ecossistema e o principal manancial de abastecimento de água para a Região Metropolitana da Grande Florianópolis, e observando-se os resultados deste estudo, destaca-se a extrema importância dos dados encontrados por alertarem para a possível ocorrência de alterações a nível epigenético. Estas alterações podem se biomagnificar ao longo da cadeia trófica atingindo os seres humanos, podendo dar início a processos degenerativos, como por exemplo, o câncer.

CAPÍTULO VI

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Este estudo teve como objetivo principal avaliar o potencial das águas do Rio Cubatão do Sul, pertencente à Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Sul/Santa Catarina em causar efeitos genotóxicos, epigenéticos e de estresse oxidativo sobre peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que:

- A aplicação do teste do micronúcleo como forma de verificação do potencial genotóxico e mutagênico das amostras de águas do Rio Cubatão do Sul demonstrou ser uma ferramenta eficaz para a verificação de tais condições visto que os resultados indicaram a ocorrência de alterações expressivas na frequência de MN de *O. niloticus*;
- A frequência de MN pode ter relação com a sazonalidade, visto que alterações na precipitação atmosférica e consequentemente no escoamento superficial de agentes potencialmente genotóxicos acarretaram em mudanças na frequência de MN para *O. niloticus* expostos a mistura ambiental complexa das águas do Rio Cubatão do Sul;
- A quantificação do percentual de m⁵dC de *O. niloticus* após a exposição crônica a mistura ambiental complexa das amostras de água do Rio Cubatão do Sul demonstrou ser um importante marcador de danos epigenéticos devido à ocorrência de hipermetilação do DNA em todo o período de estudo;
- A elevação nas taxas de MDA revelaram que a exposição crônica de *O. niloticus* a mistura ambiental complexa das águas do Rio Cubatão do Sul é capaz de provocar danos celulares que induzem ao estresse oxidativo;
- De maneira geral a confirmação de ocorrência de efeitos de estresse oxidativo, alterações genotóxicas e epigenéticas de *O. niloticus* em exposição crônica às amostras da mistura ambiental complexa das águas do Rio Cubatão do Sul denotam o grande potencial em provocar alterações a nível toxicológico destas águas.

Algumas recomendações para futuras pesquisas baseadas neste estudo são:

- Realização de estudos toxicológicos in situ para a avaliação de efeitos genotóxicos, epigenéticos e de estresse oxidativo em diferentes espécies habitantes do meio aquático;
- A quantificação de poluentes ambientais (metais e pesticidas) nos tecidos dos organismos expostos às águas do rio e nas amostras de água, com a finalidade de estabelecer relações entre o meio e os organismos.

CAPÍTULO VII

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta.** 1523, 37-48, 2000.

ALI, F. K., EL-SHEHAWI, A. M., SEEHY, M. A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. **Afr. J. Biotechnol.** 7, 606-612, 2008.

AL-SABTI, K. An *in vitro* binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. **Mutat. Res.** 335, 109-120. 1995.

AL-SABTI, K., METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.** 343, 121-135. 1995.

ALURU, N., KARCHNER, S. I., HAHN, M. E. Role of DNA methylation of AHR1 and AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish; *Fundulus heteroclitus*. **Aquat. Toxicol.** 101, 288-294, 2011.

ALVES-COSTA, J. R. M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*.** 2001. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2001.

ANA (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS). Brasil. Panorama da Qualidade das Águas Superficiais no Brasil. Cadernos de Recursos Hídricos. 2005.

ANDRADE, V. M., SILVA, J., SILVA, F. R., HEUSER, V., DIAS, J., YONEAMA, M., FREITAS, T. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two Southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 459-468, 2004.

ANIAGU S. O., WILLIAMS T. D., ALLEN Y., KATSIADAKI I., CHIPMAN J. K. Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromo-cyclododecane and 17-[beta] oestradiol. **Environ Int.** 34, 310-317, 2008.

ARIAS, A. R. L, BUSS, D. F., ALBUQUERQUE, C., INÁCIO, A. F., FREIRE, M. M., EGLER, M., MUGNAI, R. BAPTISTA, D. F.

Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.

Ciência & Saúde Coletiva, 12(1):61-72, 2007.

ARKHIPCHUK, V. V. AND GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 62, 42–52, 2005.

ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos**. 2 ed. México, 1995. 267 p.

ATLI, G., CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 25, 33–38, 2008.

ATLI, G., CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 73, 1884–1889, 2010.

AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat. Res.** 467, 177–186, 2000.

AYLLON, F., GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla*) by heavy metals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 49, 139–143, 2001.

BACCARELLI, A., BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Curr. Opin. Pediatr.** 21, 243–251, 2009.

BADERNA, D., MAGGIONI, S., BORIANI, E., GEMMA, S., MOLTENI, M., LOMBARDO, A., COLOMBO, A., BORDONALI, S., ROTELLA, G., LODI, M., BENFENATI, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. **Environ. Res.** 111, 603–613, 2011.

BAGDONAS, E., DUKELSKIS, E., LAZUTKA, J. Frequency of micronucleated erythrocytes in wild fish from natural freshwater body. **Ekologija**, 1, 67-71, 2003.

- BARDAKCI, F., SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**. 73, 117-123, 1994.
- BEYER, J., SANDVIK, M., HYLLAND, K., FJELD, E., EGAAS, E., AAS, E., SKAARE, J.U., GOKSØYR, A. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus L.*) and Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. **Aquat. Toxicol.** 36, 75-98, 1996.
- BICKHAM, J. W., SANDHU, S., HERBERT, P. D. N., CHIKHI, L. ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutat. Res.** 463:33-51, 2000.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.** 16: 6-21, 2002.
- BOLOGNESI, C., CREUS, A., WEGMAN, P. O. MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis** vol. 26 no. 1 pp. 19–26, 2011. doi:10.1093/mutage/geq070
- BOLOGNESI, C., HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**. 26, 205-213. 2011.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. 2003. 129p.
- BOVERIS, A., REPETTO, M. G., BUSTAMANTE, J., BOVERIS, A. D., VALDEZ, L. B. The concept of oxidative stress in pathology. In: Álvarez, S.; Evelson, P. (ed.), **Free Radical Pathophysiology**, pp. 1-17, Transworld Research Network: Kerala, India, ISBN: 978-81-7895-311-313, 2008.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye. **Anal. Biochem.** 72, 248-254, 1976.
- BRESLER, V. M., FISHELSON, L., ABELSON A. Determination of primary and secondary responses to environmental stressors and biota health, In: I. Linkov, J. Palma-Oliveira (Eds.), **Assessment and Management of Environmental Risks**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 57–70. 2001.

BUCHELI, T.D., FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** 25, 201-268, 1995.

CAMPANA, M. A., PANZERI, A. M., MORENO, V. J., DULOUT, F. N. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genet. Mol. Biol.** 26, 99-104, 2003.

CAMPOS-VENTURA, B., DE-ANGELIS, D.F., MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90, 42-51, 2008.

CARNEIRO, F., PIGNATI, W., RIGOTTO, R. M., AUGUSTO, L. G. S., RIZZOLO, A., MULLER, N. M., ALEXANDRE, V. P., FRIEDRICH, K., MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar, Nutricional e Saúde.** Rio de Janeiro. 2012.

Disponível em:

http://www.abrasco.org.br/UserFiles/Image/_Dossie%20abrasco%20por%20t.pdf. Acesso em março de 2013.

CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L. AND MYERS, M. S.

Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 47, 2123-2136, 1990.

CASAN (COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E ABASTECIMENTO). 2013a. **Expedição ao Rio Cubatão.** Disponível em: <http://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/expedicao-aorio-cubatao#0> Acesso em dezembro de 2012.

CASAN (COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E ABASTECIMENTO). 2013b. **Índice de Atendimento Urbano – Esgoto.** Disponível em: <http://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/indices-de-atendimento-urbano-esgoto#1221> Acesso em julho de 2013.

CASTILHOS JR., A. B., OLIVEIRA, F. B. Diagnóstico de produtos residuários do uso de agrotóxicos utilizados na bacia hidrográfica do Cubatão do Sul - BHCS/SC. **Agropecuária Catarinense**, Santa Catarina. 13, 48-51, 2000.

CATALA, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. V. 38, 1482-1495, 2006.

ÇAVAS, T., ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutat. Res.** v. 538, 81-91, 2003.

ÇAVAS, T., ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat. Toxicol.** 74, 264-271, 2005.

ÇAVAS, T., KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**. 22, 263–268, 2007.

ÇAVAS, T. *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food Chem. Toxicol.** 49, 1431–1435, 2011.

CEPA (CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA). **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina, 2011 – 2012**. 2012. Disponível em: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2012/sintese%202012.pdf Acesso em janeiro de 2013.

CHOVANEC, A., HOFER, R., SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and Biomonitoring**. Netherlands: Elsevier Science, p. 639-669. 2003.

CHRISTOFIDIS, M. **O enquadramento participativo de corpos d'água como um instrumento da gestão de recursos hídricos com aplicação na Bacia do Rio Cubatão do Sul – SC**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

CLAXTON, L.D., HOUK V.S., HUGHES T.J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutat. Res.** 410, 237-43, 1998.

COLLOTA, M., BERTAZI, P. A., BOLLATI, V. in press. Epigenetics and pesticides. **Toxicology**, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, 23p. 2005.

CONTRACTOR R. G., FORAN C. M., LI S., WILLETT K.L. Evidence of gender and tissue specific promoter methylation and the potential for ethinylestradiol induced changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor and aromatase genes. **J Toxicol Env Health**, 67, 1-22, 2004.

COTRIM, D. 2002. **Piscicultura: manual prático**. Porto Alegre: EMATER-RS, 1995. 37 p. Revisado em 1997, 1999, 2000 e 2002.

CRISTALDI, M., IERADI, L. A., UDROIU, I., ZILLI, R. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. **Mutat. Res.** 559, 1-9, 2004.

DATTA, C., GUPTA, J., SARKAR, A., SENGUPTA, D. Effect of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. **Indian Journal of Experimental Biology**, 30: 65–67, 1992.

DEARFIELD, K. L., CIMINO, M. C., MCCARROLL, N. E., MAUER, I., VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.** V. 521, 121-135, 2002.

DEGUCHI Y, TOYOIZUMI T, MASUDA S, YASUHARA A, MOHRI S, YAMADA. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutat Res.** v. 627, 178–85, 2007.

DIANZANI, M., BARRERA, G. Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. In: Álvarez, S.; Evelson, P. (ed.), **Free Radical Pathophysiology**, pp. 19-38, Transworld Research Network: Kerala, India. 2008.

ERGENE, S., ÇAVAS, T. ÇELİK, A. KÖLEİL, N., AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environ. Mol. Mutagen.** 48, 421-429, 2007.

ESPADA, J., ESTELLER, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment, **Seminars in Cell & Developmental Biology**, V. 21(2), 238-246, 2010.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol**, v. 4, 351-359, 2003.

ESTELLER, M., CORN P. G., BAYLIN S. B., HERMAN J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res.** 61. 3225-3229, 2001.

ESTERBAUER H., SCHAUR R.J, ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, V. 11(1), 81-128, 1991.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) **Fisheries. The state of world fisheries and aquaculture 2006**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FLEEGER J. W., CARMAN K. R., NISBET R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Sci. Total Environ.** 317, 207-233, 2003.

FLOHR, L. 2011. **Aplicação e validação do modelo WTox para avaliar risco ambiental toxicológico de misturas complexas: estudo de caso em amostras de resíduos industriais**. Florianópolis, SC, 255 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

FLOHR, L., FUZINATTO, C. F., MELEGARI, S. P., MATIAS, W. G. Effects of exposure to soluble fraction of industrial solid waste on lipid peroxidation and DNA methylation in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, as assessed by quantification of MDA and m⁵dC rates. **Ecotox Env Saf.** 63-70, 2012.

FLORA, S., BAGNASCO, M., ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutat. Res.** 258, 285-320, 1991.

FLORA, S., VIGANO, L. D'AGOSTINI, F., CAMOIRANO, A., BAGNASCO, M., BENNICELLI, C., MELODIA, F., ARILLO, A.

Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water. **Mutat Res.** 29-36, 1993.

GADAGBUI, B. K. M., ADDY, M., GOKSØYR, A. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*) **Comp. Biochem. Physiol.** 114, 201–211, 1996.

GADZALA-KOPCIUCH, R., BERECKA, B., BARTOSZEWICZ, J., BUSZEWSKI, B. Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring. **Polish Journal of Environmental Studies** Vol. 13, No. 5, 453-462., 2004.

GALINDO, T. P., MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genet. Mol Biol.** 32, 394-398, 2009.

GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., CRESTANI, M., FONSECA, M.B., PEDRON, F.A., DUARTE, M.F., VIEIRA, V.L.P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecot. Environ. Saf.** 65, 237–241, 2006.

GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., MORAES, B.S., SIMOES, R.R., SCHETINGER, M.R.C., MORSCH, V.M., LORO, V.L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp. Biochem. Physiol. C.** 146, 519–524, 2007.

GRAVATO, C., GUIMARÃES, L., SANTOS, J., FARIA, M., ALVES, A., GUILHERMINO, L. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). **Ecot. Environ. Saf.** v.73, 524–533, 2010.

GRISOLIA, C.K., CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genet. Mol. Biol.** 23, 235–239, 2000.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutat. Res.** 518, 145-150, 2002.

GRISOLIA, C. K., RIVERO, C.L.G., STARLING, F.L.R.M., DA SILVA, I.C.R., BARBOSA, A.C., JOSE G. DOREA, J.G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genet. Mol. Biol.** 32, 138-143, 2009.

GRISOLIA, C. K., STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutat. Res.** v.491, 39-41, 2001.

GRONBAEK K, HOTHER C, JONES P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS.** 115, 1039-1059, 2007.

GUIMARÃES, Z. V. **Os recursos hídricos utilizados para abastecimento populacional e o desenvolvimento urbano em Florianópolis.** Dissertação (Mestrado Engenharia Ambiental)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press, 2005. 936 p.

HARSHBARGER, J. C., CLARK, J. B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, v. 94(1-2), 1-32. 1990.

HAYASHI, M., MORITA, T., KODAMA, Y., SOFUNI, T. ISHIDATE, M. J. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange-coated slides. **Mutat. Res.** 245, 245-249, 1990.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry : role of free radicals. In : Storey, K. B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.** Wiley-Liss, Hoboken. 319-368, 2004.

HOFFMAN, R. N., RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) en the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pigmaea* by ethil methanesulphonate. **Mutat. Res.** 104, p. 147-152. 1982.

HOLT, E. A., MILLER, S. W. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. **Nature Education Knowledge** 3(10):8. 2011.

HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Strees.** A special publication of the Society of

Environmental Toxicology and Chemistry. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1992, ISBN 087371-505-5.

HUGHES, J.B. AND HEBERT, A. T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. **Arch. Environ. Contamin. Toxicol.** 20, 474-479, 1991.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Chromium, nickel and welding. In: IARC, editor. **Monographs on the evaluation of carcinogenesis risk to humans.** Lyon: IARC, 49—255. 1990.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). 2010. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>. Acesso em abril, 2013.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). ESTATCART – Sistema de Recuperação de Informações Georreferenciadas. Censo 2010 – Setores Censitários. Banco de dados disponível em: geoftp.ibge.gov.br/malhas_digitais/censo_2010/setores_censitarios/sc.zip. Acesso em 15/dez/2012

JIN, Y.X.; ZHANG, X.X.; SHU, L.J.; CHEN, L.F.; SUN, L.W.; QIAN, H.F.; LIU, W.P., FU, Z.W. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78, 846–852, 2010.

JONES P. A., BAYLIN S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet.** 3(6), 415-28, 2002.

JONES P. A., BAYLIN S. B. The epigenomics of cancer. **Cell.** 128(4), 683-92, 2007.

JOSEPH, B., RAJ, S.J. Effect of curacron toxicity on the total serum protein content of *Cyprinus carpio*. **Toxicol. Environ. Chem.**, 92, 1889-1893, 2010.

KADRY, S. M., MARZOUK, M. S., AMER, A. M., HANNA, M. I., AZMY, A. H. AND HAMED, H. S. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. **Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish.** 16, 83 – 98, 2012.

- KAYHANIAN M, SUVERKROPP C, RUBY A AND TSAY K. Characterization and prediction of highway runoff constituent event mean concentration. **J. Environ. Manag.** 85, 279-295, 2007.
- KLIGERMAN, D. Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents. In: J. Heddle (Ed.) **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**, Academic Press, New York, USA, p. 435-456, 1982.
- KLUMP, A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. In: Maia, N. B., Martos, H. L., Barrella, W. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**: São Paulo, EDUC/COMPED/INEP, 2001. 285p.
- KONDO, K., TAKAHASHI, Y., HIROSE, Y., NAGAO, T., TSUYUGUCHI M., HASHIMOTO, M., OCHIAI, A., MODEN, Y., TANGOKU, A. The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. **Lung Cancer.** 53, 295-302, 2006.
- KULLIS, M., ESTELLER, M. Epigenetics and Cancer, Part A. **Advances in Genetics**, 70, 27–56, 2010.
- KURAKU S., MEYER A. Genomic analysis of cichlid fish ‘natural mutants’. **Curr Opin Genet Dev** 18:551–558, 2008.
- LABRA, M., GRASSI, F., IMAZIO, S., DI FABIO, T., CITTERIO, S., SGORBATI, S., AGRADI, E. Genetic and DAN-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus L.* **Chemosphere.** 54, 1049-1058, 2004.
- LAH, B., VIDIC, T., GLASENCNIK, E., CEPELJNIK T., GORJANC G., MARINSEK-LOGAR, R. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. **Environ. Monit. Assess.** 139, 107–118, 2008.
- LAM, P. K. S., GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, 46, 182-186, 2003.
- LAMBOLEZ, L., VASSEUR, P., FERARD, J.F., GISBERT, T. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 28, 317–328, 1993.

LANGIANO, V.C., MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol. C** 147, 222–231, 2008.

LASHEEN, M. R., ABDEL-GAWAD, F. K., ALANENY, A. A. AND ABD EL BARY, H. M. H. Fish as Bio Indicators in Aquatic Environmental Pollution Assessment: A Case Study in Abu-Rawash Area, Egypt. **World Appl. Sci. J.**, 19, 265-275, 2012.

LATORRACA A., MARQUES G., SOUSA K., FORNÉS N. Pesticides used in tomato production in Goiania and Goianópolis and their effects on human health. **Ciências Saúde** 19, 365-374, 2008.

LEMONS, C.T., ERDTMANN, B. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. **Mutat. Res.** 467, 1–9, 2000.

LEMONS, C. T., RÖDEL, P. M, TERRA, N. R. OLIVEIRA, N. C. D., ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 66, 391–401, 2007.

LI, J., LIN., J. C., WANG, H., PETERSON, J. W., FURIE, B. C., FURIE, B., BOOTH, S. L., VOLPE, J. J., ROSENBERG, P. A. Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to developing Oligodendrocytes and Neurons. **The Journal of Neuroscience.** 23, 5816-5826, 2003.

LI, D., LU, C. , WANG, L. , HU, W., CAO, Z., SUN, D., XIA, H., MA, X. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquat. Toxicol.** 91, 229-237, 2009.

LIU, Y.; WANG, J.S.; WEI, Y.H.; ZHANG, H.X.; XU, M.Q. AND DAI, J.Y. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver **Aquat. Toxicol.** 89 : 242–250, 2008.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.** 101 (1), 13-30, 2011.

MAHATA, J. BASU, A., GHOSHAL, S., SARKAR, J. N., ROY, A. K., PODDAR, G., NANDY, A. K., BANERJEE, A., RAY, K., NATARAJAN, A. T., NILSSON, R., GIRI, A. K. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to

- arsenic through drinking water in West Bengal, India. **Mutat. Res.** 534:133-143, 2003.
- MARKET, B., BREURE, A. M., ZECHMEISTER, H. G. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: MARKERT, B.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and biomonitoring**. Netherlands: Elsevier Science. 3-39, 2003.
- MARTINS, R. P., MELO FILHO, E., FRANCO, D. **Circulação hidrodinâmica e dispersão de poluentes na Baía de Florianópolis**. Relatório, 1997.
- MATIAS, W. G., CREPPY, E. E. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Ocadáico, uma toxina marinha. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 4, 40-44, 1998a.
- MATIAS, W. G., CREPPY, E. E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environ. Toxic. Water**. v.04, p. 83-88, 1998b.
- MATSUMOTO, F.E., CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genet. Mol. Biol.** 23, 489-492. 2000.
- MATSUMOTO S. T. **Efeitos tóxicos e genotóxicos de metais pesados, especificamente do cromo trivalente e hexavalente**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto. 2003.
- MATSUMOTO S. T., MARIN-MORALES M. A. Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia** 69, 399-408, 2004.
- MATSUMOTO, S.T., MANTOVANI M.S., MALAGUTTI M.I.A., DIAS A.L., FONSECA, I.C., MARIN-MORALES M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genet. Mol. Biol.** 29, 148-158, 2006.
- MÍDIO, A., MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295p.
- MILLAR, D. S., HOLLIDAY, R., GRIGG, G. W. Five not four: history and significance of the fifth base. In: **The Epigenome, Molecular Hide**

and Seek. Beck, S., Olek, A. (Eds.), Wiley–VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim, 3–20. 2003.

MINISSI, S., CICCOTTI, E., RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutat. Res.** v. 367, 245-251, 1996.

MIRBAHAI L, WILLIAMS TD, ZHAN H, GONG Z, CHIPMAN JK. Comprehensive profiling of zebrafish hepatic proximal promoter CpG island methylation and its modification during chemical carcinogenesis. **BMC Genomics**; 12:1-16, 2011.

MISHRA, A., MOHANTY, B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 26, 136-141, 2008.

MODESTO K. A., MARTINEZ C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere.** 78, 294–299, 2010.

NAIR, U., BARSTTSCH, H., NAIR, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. **Free Radical in Biology & Medicine.** Vol. 43, pp. 1109-1120, 2007.

NELSON J. S. **Fishes of the world**, 4th edn. Wiley, New York, 2006. 390p.

NORMANN, C. A. B. M., MOREIRA, J. C. F., CARDOSO, V. V. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecotomus* exposed to potassium Dichromate. *Afr. J. Biotechnol.*, 7,893-896, 2008.

O'BRIEN T., XU J., PATIERNO S. R. Effects of glutathione on chromium-induced DNA crosslinking and DNA polymerase arrest. **Mol. Cell. Biochem.** 222, 173-182, 2001.

OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutat. Res.** 567, 109–149, 2004.

OMAR, W. A., ZAGHLOUL, K. H., ABDEL-KHALEK, A. A., ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. **Mutat. Res.** 746, 7-14, 2012.

- OSMAN, ALAA G. M., ABD EL REHEEM, ABD-EL-BASET M., MOUSTAFA, MOHSEN A., MAHMOUD, USAMA M., ABUEL-FADL, KHALED Y. AND KLOAS, WERNER. *In situ* evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: I. Micronucleus and nuclear lesion tests of erythrocytes of *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), **Toxicol. Environ. Chem.** 93. 1002 — 1017, 2011.
- PANTALEÃO, S. M., ALCÂNTARA, A. V., ALVES, J. P. H., SPANÓ, M. A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Jarapatuba River in Brazil. **Environ. Mol. Mutagen.** 47, 219-224, 2006.
- PENDAS, A.M., MORAN, P., GARCIA-VAZQUEZ, E. Improvements to Atlantic salmon anterior kidney metaphase yields following phytohemagglutinin injection. **J. Fish. Biol.** 42, 801–802, 1993.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., FUCHS, R. P. P., DIRHEIMER, G. In vitro enzymatic methylation of DNA substituted by N-2-aminofluorene. **FEBS Lett.** v. 178, 56-60, 1984.
- POLARD, T., JEAN, S., GAUTHIER, L., LAPLANCHE, C., MERLINA, G., SÁNCHEZ-PÉREZ, J. M., PINELLI, E. Mutagenic impact on fish runoff events in agricultural areas in south-west France. **Aquat. Toxicol.** 101, 126-134, 2011a.
- POLARD, T., JEAN, S., MERLINA, G., LAPLANCHE, C., PINELLI, E. GAUTHIER, L. Giemsa *versus* acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 74, 144-149, 2011b.
- POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, v. 246, n. 4928, p. 352-358. 1989.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE ÁGUAS MORNAS, 2013. Disponível em: <http://www.aguasmornas.sc.gov.br/historico.htm>. Acesso em janeiro de 2013.
- PRETTI, E., CAVALCANTE, D. SIMONATO, J. D., MARTINEZ, C. B. R. **Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel de gasolina.** In: Congresso de Ecologia do Brasil, VIII, Caxambu-MG. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. São Paulo: SEB, 08.11.2007. v.1. 2007.

PRIETO, Z., LÉON-INCIO, J., QUIJANO-JARA, C., FERNÁNDEZ, R., POLO-BENITES, E., VALLEJO-RODRÍGUEZ, R., VILLEGAS-SANCHEZ, L. Efecto genotóxico del dicromato de potássio em eritrócitos de sangue periférica de *Oreochromis niloticus* (tilapia). **Ver Peru Med Exp Salud Publica**, 51-58, 2008.

PROENÇA, E. C. M.; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: IBAMA, 1994. 195 p.

RAGAJURU, P., SUBA, S., PALANIVEL, M. KALAISELVI, K. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and Earthworm tissues. **Environ Mol Mut.** 41, 85-91, 2003.

REIFFERSCHIED G., GRUMMT T. Genotoxicity in German surface waters – results of a collaborative study. **Water Air Soil Pollut.** 123, 67-79, 2000.

RIBEIRO, L. R., MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental**. Editora da Ulbra. Canoas-RS. 2003. 365 p.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora da Ulbra. Canoas-RS. 2003. 365 pp.

ROCHA, C. A. M., GOMES, C. D. F., JÚNIOR, R. F. G. R., PINHEIRO, R. H. S. Detection of Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in *Oreochromis niloticus* Exposed to Potassium Dichromate. **Global Veterinaria**, 301-304, 2011.

ROCHA, P. S., LUVIZOTTO, G. L., KOSMEHL, T., BÖTTCHER, M., STORCH, V., BRAUNBECK, T., HOLLERT, H. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): *In vitro* comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, 1842-1848, 2009.

RODRIGUEZ-CEAA, F. AYLON AND GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: An evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 56, 442-448, 2003.

RUSSO, C., LUCIA, R., MORESCALCHI, M. A., STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V.57, p. 168-174, 2004.

- SABO-ATTWOOD, T., RAMOS-NINO, M., MOSSMAN, B.T. Environmental carcinogenesis. In: Chang, A., Ganz, P. (Eds.), **Oncology: an evidence-based approach**. Springer Verlag Publishers, 233-243, 2005.
- SADAUSKAS-HENRIQUE, H., SAKURAGUI, M. M., PAULINO, M. G., FERNANDES, M. N. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. **Environmental Monitoring and Assessment**, 181, 29 – 42, 2011.
- SAKURAGUI, M. M., PAULINO, M. G., PEREIRA, C. D. S., CARVALHO, C. S., SADAUKAS-HENRIQUE, H., FERNANDES, M. N. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, 178, 41-51, 2013.
- SALVAGNI, J., TERNUS, R. Z., FUENTEFRÍA, A. M. Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. **Gen. Mol. Biol.** 34, 122-126, 2011.
- SAMPAIO, F.G., BOIJINK, C.L., OBA, E.T., SANTOS, L.R.B., KALININ, A.L., RANTIN, F.T. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comp. Biochem. Physiol. C** 147, 43–51, 2008.
- SÁNCHEZ-GÁLÁN, S., LINDE, A. R., IZQUIERDO, J. I., GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutat. Res.** 412, 219-225. 1998.
- SANTA CATARINA. **Portaria nº 024. Enquadra os cursos d'água do Estado de Santa Catarina.** 1979.
- SANTA CATARINA. **Lei nº 10.949 de 09 de novembro de 1998. Dispõe sobre a caracterização do Estado em dez Regiões Hidrográficas.** 1998.
- SANTA CATARINA. **Panorama dos Recursos Hídricos de Santa Catarina. Secretaria de Desenvolvimento Sustentável. Florianópolis: Diretoria de Recursos Hídricos, 2007. 283p.** Disponível em: <http://www.aguas.sc.gov.br/sirhsc/>. Acesso em junho de 2013.

SCHULZE, L. D., OGG, C., VITZTHUM, E. F. EC97-2505 Signs and Symptoms of Pesticide Poisoning. 1997. **Historical Materials form University of Nebraska – Lincoln Extension. Paper 1225**. Available on: <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/1225> Acesso em dezembro de 2012.

SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, C.A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, 313, 1072–1077, 2006.

SDM-FEHIDRO (SECRETARIA DE ESTADO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE – FUNDO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS. **Plano Integrado dos Recursos Hídricos da Bacia do Rio Cubatão do Sul**. 2003.

SDS – SECRETARIA DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SUSTENTÁVEL. Plano Municipal de Saneamento Básico de Águas Mornas, Fase I – Processo de participação da sociedade na elaboração do Plano e Fase II - Diagnóstico da situação do saneamento e de seus impactos nas condições de vida da população. Lote 3. 2011. 189p.

Disponível em:

<http://www.aguasmornas.sc.gov.br/noticias/pmsb/Fases%20I-II/DIAGN%D3STICO%20%20C1GUAS%20MORNAS.pdf>
Acesso em julho de 2013.

SEBRAE (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Manual do Piscicultor – Produção de Tilápia em Tanque-rede**. 2008. 39p.

SEEHAUSEN O. African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research. **Proc Biol Sci** 273, 1987–1998, 2006.

SHARMA, G., SINGH, S. Studies on the effect of intoxicant indofil on the blood morphology of *Channa punctatus* (Bloch.) **Bionotes**, 6, 20-20, 2004.

SHARMA, G., SINGH, S. Assay of some blood parameters of the fish, *Channa punctatus* (Bloch.) after intoxication of Indofil. **Bionotes**, 8, 21-21, 2006.

SHARMA, G., SINGH, S. Effect of indofil toxicity on MCHC of *Channa punctatus* (Bloch.). **J. Environ. Res. Dev.** 261-263. 2007.

SHARMA, S., KELLY, T. K., JONES, P. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, 31, 27-36, 2010.

SHUGART L. R. 5-methyl deoxycytidine content of DNA from bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) exposed to benzo[a]pyrene. **Environ Toxicol Chem.** 9, 205-208, 1990.

SILVA, J. ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre/RS: Alcance, 2003. 424p.

SOUZA, R. T. **Uso de Equipamentos de Proteção Individual na Pulverização de Videiras**. 2006. Porto Alegre: EMBRAPA, 2006, p. 8 -10. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em fevereiro de 2012.

SOUZA, T. S., FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutat. Res.** p. 87-93, v. 605, 2006.

STROMQVIST M, TOOKE N, BRUNSTROM B. DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*)-sex and tissue differences and effects of 17 α -ethinylestradiol exposure. **Aquat Toxicol.** 98, 275-81, 2010.

SUCMAN, E., VÁVROVÁ, M., ZLÁMALOVÁ G. H., MAHROVÁ, M. Fish – Useful Bio-Indicators For Evaluation Of Contamination In Water Ecosystems. 2006. **Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy**: Vol. 11, Article 3. Available at: <http://scholarworks.umass.edu/soilsproceedings/vol11/iss1/3> Accessed on september 2012.

SUMMAK S., AYDEMIR, N. C., VATAN O., YILMAZ D., ZORLU T., BILALOG R. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. **Food Chem. Toxicol.** 48, 2443–2447, 2010.

TAGLIARI, K.C., CECCHINI, R., ROCHA, J.A.V., VARGAS, V.M.F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. **Mutat. Res.** 561, 101–107, 2004.

TAHERIANFARD, M., EBRAHIMI M., SOODBAKHS, S.
Bioaccumulation of Mercury in Fishes of Kor River. **Austr. J. Bas. Appl. Sci.** 2, 904-908, 2008.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.

TRAORE, A., RUIZ, S., BAUDRIMONT, I., SANNI, A., DANO, S. D., GUARIGUES, P. H., NARBONNE, J. F., CREPPY, E. E.
Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m⁵dC and 8-(OH)-dG) in Caco-2 cells. **Mol. Toxicol.** 74, 79-84. ., 2000.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquat. Toxicol.** 79, 201–204, 2006.

UMBUZEIRO, G. A., ROUBIECK, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, p. 327-344. 2003.

USGS (US GEOLOGICAL SURVEY SCIENCE FOR A PESTICIDES IN STREAM SEDIMENT AND AQUATIC BIOTA). 2010.
<http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/fs09200/fs09200.pdf>. Acesso em abril, 2013.

VALAVANIDIS, A., VLAHOIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCULLOS, M. BERNARDI, G. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.178- 189, 2006.

VALAVANIDIS, A., VLACHOGIANNI, T. “**Integrated Biomarkers in Aquatic Organisms as a Tool for Biomonitoring Environmental Pollution and Improved Ecological Risk Assessment**”. 02.2010, 2010. Available on <http://chem-tox-ecotox.org/wp/wp-content/uploads/2010/01/01-January-20101.pdf> Acesso em novembro de 2012.

VALKO, M. RHODES, C. J., MONCOLA, J., IZAKOVIC, M., MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Bio. Interactions**, v. 160, 1-40, 2006.

- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 13, 57–149, 2003.
- VARGAS, V.M.F., MIGLIAVACCA, S.B., MELO, A.C., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., FERREIRA, I.C.F.S., PESTANA, M.H.D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutat. Res.** 490, 141-158, 2001.
- VARRIALE, A., BERNARDI, G. DNA methylation and body temperature in fishes. **Gene**, 111-121, 2006.
- VELISEK, J.; STARA, A.; KOLAROVA, J. AND SVOBODOVA, Z. Biochemical, physiological and morphological responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. after long term exposure to terbutryn in real environmental concentration. **Pest. Biochem. Physiol.** 100: 305-313, 2011.
- VIGANÒ, L., CAMOIRANO, A., IZZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., POLESELLO, S., FRANCISCI, C., DE FLORA, S. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. **Mutat. Res.** 515, 125–134, 2002.
- VIJAYANM M. M., MORGAN, J. D., SAKAMOTO, T., GRAU, E. G., IWAMA, G. K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 2467-2475, 1996.
- VRYZAS, Z., ALEXOUDIS, C., VASSILIOU, G., GALANIS, K., PAPAPOPOULOU-MOURKIDOU, E. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 74, 174–181, 2011.
- VON BURG, R. LIU, D. Chromium and hexavalent chromium. **Journ. Appl. Toxicol.** 13, 225-230, 1993.
- XING, H.; LI, S.; WANG, Z.; GAO, X.; XU, S. AND WANG, X. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. **Pest. Biochem. Physiol.** *In Press.*, 2012.
- WANG Y, WANG C, ZHANG J, CHEN Y, ZUO Z. DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. **Aquat Toxicol.** 95,93-98. 2009.

WHITE, P. A., RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat. Res.** 410, 223-236, 1998.

WHITE, P. A. The sources and potential hazards of mutagens in complex environmental matrices. **Mutat. Res.** 567, 107-108, 2004.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**. International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria, 1993. 155p.

WILD C. P. Environmental exposure measurement in cancer epidemiology. **Mutagenesis** 24, 117-25, 2009.

WILHELM FILHO, D. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. **Front. Biosci.** 12, 1229-1237, 2007.

WILLIAMS, R. C., METCALFE, C. D.. Development of an in vivohepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquat. Toxicol.** 23, 193-202. 1992.

WIRZINGER, G., WELTJE, L., GERCKEN, J. AND SORDYL, H. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus L.*): A suitable biomonitoring tool. **Mutat. Res.** 628, 19-30, 2007.

WOLFFE, A. P. MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through expression. **Science.** 286: 481-486, 1999.

ZHITKOVICH A., VOITKUN V., COSTA M. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium *in vitro*: Importance of trivalent chromium and the phosphate group. **Biochem.** 35, 7275-7282, 1996.

ZHOU XW, ZHU GN, JILISA M, SUN JH. Influence of Cu, Zn, Pb, Cd and their heavy metal ion mixture on the DNA methylation level of the fish (*Carassius auratus*). **China Environ Sci**, 21, 549-52, 2001.

CAPÍTULO VIII

8 APÊNDICES

A1. Artigo 1

Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil

Cristiane F. Fuzinato^a, Letícia Flohr^a, Sílvia P. Melegari^a and William G. Matias^a, *

^aLaboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.

* Corresponding author: Prof. William G. Matias - Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brasil. Telephone number: + 55 48 3721-7742; Fax number: +55 48 3721-9823. E-mail address: william.g.matias@ufsc.br

ABSTRACT

In an effort to characterize the pollution of surface waters by potentially genotoxic agents, this study aimed at assessing the frequency of micronucleated (MN) erythrocytes of the fish species, *Oreochromis niloticus*, from the Cubatão do Sul River. This river is the source of drinking water for the region of Florianópolis, capital of Santa Catarina State, Brazil. Negative control fish showed low frequency of MN, ranging between 0.49 - 0.90%. Positive control (potassium dichromate 2.5 mg/L) organisms showed high MN frequency (16.82 - 17.25%). The MN frequency increased along the river (Site 1: 1.24% winter 2011; Site 4: 9.76% summer 2011). Based on the observation of elevated MN erythrocytes frequency in *O. niloticus* exposed to water samples from along the river course, we conclude that the complex environmental mixtures of water from the Cubatão do Sul River have genotoxic potential. This genotoxicity most likely originated from agricultural runoff and domestic effluents released without treatment, based on the evidence from literature data and a survey in the region. This study

provides a scientific basis for future studies regarding the genotoxicity of complex environmental mixtures in natural environments.

KEYWORDS: Cubatão do Sul River; micronucleus; *Oreochromis niloticus*; genotoxic effects.

ABBREVIATIONS: MN: micronucleus

1. INTRODUCTION

Aquatic pollution is a primary environmental concern in urban areas. The deliberate and/or accidental release of harmful chemicals in the environment has the potential to disturb the structure and functioning of natural ecosystems (Çavas and Ergene-Gözükar, 2005).

All rivers on the central coast of Santa Catarina State (southern Brazil) present some degree of pollution, mainly from domestic and industrial effluents, solid waste, pesticides (ANA, 2005). The hydrographic basin of the Cubatão do Sul River is the most alarming because of its water supply importance. According to the local water treatment and sanitation utility (CASAN, 2013), in recent years, the Cubatão do Sul River has suffered significant bank erosion with the removal of riparian vegetation; as a consequence, this loss has contributed to a decrease in water volume over the years. Moreover, in the Cubatão do Sul River basin, there is widespread cultivation of vegetables and cattle, and these activities, along with the removal of riparian vegetation, domestic sewage runoff and sand mining, are degrading the borders and the quality and quantity of its waters (Martins et al. 1997).

Most of the genotoxic load found in river waters derives from runoff from urban activities, indicating the negative impact urbanization has on the quality of surface waters (White and Rasmussen, 1998). Chemical compounds with mutagenic potential are present in a variety of complex environmental mixtures, including drinking water, surface water, aquatic sediments, soil and the atmosphere (White, 2004). The aquatic environment is the ultimate recipient of pollutants produced by natural and anthropogenic sources, and the bioaccumulation and persistence of these pollutants poses a threat to biological life (Fleeger et al. 2003). These points have spurred an interest in studies of the genotoxicity of polluted environments, especially assessments of the impacts of agricultural, domestic and industrial effluents on river water (Lemos and Erdtmann, 2000; Vargas et al. 2001; Viganò et al. 2002; Tagliari et al. 2004; Ohe et al. 2004; Pantaleão et al. 2006; Ergene et al. 2007; Lemos et al. 2007; Rocha et al. 2009; Summak et al. 2010; Polard et al. 2011a; Omar et al. 2012).

Micropollutants from agricultural and domestic effluents, even at low concentrations, may interact synergistically or antagonistically, and the combination of these effects cannot be predicted by chemical analysis. Therefore, toxicological studies are essential for identifying these effects (Lambolez et al. 1993; Van der Oost et al. 2003; Schwarzenbach et al. 2006). The understanding of hazards related to the additive/synergistic effects of mutagenic agents in complex environments is limited, mainly because the acute effects arising from each of these agents are not related to one another, and the most frequently observed chronic effects cannot be identified in the short term (Schwarzenbach et al. 2006).

The evaluation of the chronic effects of pollutants is very complex due to the long time frame required for detection (Schulze et al. 1997). Chronic effects are a consequence of a long time exposure, possibly to a low intensity of a toxic agent, which is generally released continuously or over the course of weeks, months or years; these toxic agents can accumulate in organisms, leading to damaging effects (Souza, 2006). Mutation, cellular aging, difficulty adapting to environmental changes and carcinogenesis are some of the consequences that affect organisms and are caused by continuous exposure to genotoxins (Reifferscheid and Grummt, 2000). The genotoxicity of complex mixtures can be evaluated by exposing living organisms, which are later examined to assess the occurrence of genetic damage (Lah et al. 2008).

Several species can be used as biomarkers of genotoxicity (Cristaldi et al. 2004). Fish are efficient organisms for monitoring cytogenetic damage and to monitor the presence of these agents in surface water, not only in the laboratory, where the genotoxic agents can be identified in advance, but also in different aquatic ecosystems. These organisms can accumulate pollutants by direct contamination, through chemical substances present in water, or indirectly through the ingestion of organisms that accumulate pollutants themselves (Al-Sabti, 1995; Van der Oost et al. 2003; Taherianfard et al. 2008) because they represent the last trophic level in the aquatic food chain and are very sensitive to environmental changes (Lakra and Nagpure, 2009). Fish act in response to genotoxic agents similarly to higher vertebrates, which makes them a good model organism for evaluating substances that are potentially teratogenic, mutagenic or carcinogenic to humans (Flora et al. 1991; Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Matsumoto and Colus, 2000; Udroui, 2006; Lemos et al. 2007). Erythrocytes of lower vertebrates, such as fish and amphibians, are nucleated and divided in circulation. Therefore, these

cells are suitable for the detection of micronuclei that can be immediately counted in blood smears (Campana et al. 2003).

Given that natural aquatic environments are heavily impacted by and are potential recipients of different pollutants, many with genotoxic potential, this study aims to verify the genotoxic potential of complex environmental mixtures taken from the Cubatão do Sul River, an important source of water for the region of Florianópolis, on the fish species *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), by analyzing the frequency of micronucleus.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area

The Cubatão do Sul River belongs to the Hydrographic Basin of the Cubatão do Sul River and is located in southern Brazil, in the central coast of Santa Catarina State, between parallels 27°35'46"S and 27°52'50"S and longitudes 48°38'24"W and 49°02'24"W. This river is 65 km long and covers an area of 738 km². This river supplies water to part of the city of Florianópolis (the capital of Santa Catarina State) and its metropolitan area (the cities of Santo Amaro da Imperatriz, São José, Palhoça and Biguaçu), serving a population of approximately 700,000 inhabitants (Fig. 1). According to the Santa Catarina Atlas (Kaiser et al. 2012), rainfall is distributed throughout the year. The months with the greatest precipitation are January, February and March, and the months with lowest rates are May and June. Water samples were collected from four different sites on the Cubatão do Sul River, each 15 days (Fig. 1): the upper Cubatão do Sul River (site 1), in the vicinity of Águas Mornas city (site 2), in the vicinity of Santo Amaro da Imperatriz city (site 3), and the lower Cubatão do Sul river (site 4). Water samples were collected over 280 days, beginning in spring 2010 and finishing in winter 2011.

2.2 Test organisms

In this study, 132 *O. niloticus* fish (Perciformes: Cichlidae) (mean weight = 31.5 ± 0.5 g, length = 11 ± 2 cm) were used. Fish were acclimated for a period of 15 days in a tank with capacity for 1.000 L, filled with about 950 L of chlorine-free water, aerated, with diffuse light (photoperiod of 16 h) and at 20 ± 2°C. According with guidelines of Burress (1975), the water load applied during the acclimation period was about 2.77 g/L since in the beginning of the study period the fish used had an average weight of 20 ± 2°g. The organisms were fed every 48 h with food for juvenile fish (Peixe Juvenil, Acqua Line, Supra, RS,

Brazil) containing 42% protein and 500 mg/kg vitamin C. The remains of uneaten food and fecal material were removed from the storage tanks, and water was renewed every 48 h.

2.3 Fish exposure assays

After the acclimation period, fish were subdivided randomly into 6 experimental groups with 22 organisms each. Each group was kept in a 130 L tank containing water collected from site 1, 2, 3 or 4 of the Cubatão do Sul River (Fig. 1). As a negative control, we used mineral water collected from the Caldas fountain, located at Santo Amaro da Imperatriz. As a positive control, two fish were exposed every 48 h before the blood extraction to a solution of 2.5 mg/L potassium dichromate (sublethal concentration of $K_2Cr_2O_7$ adapted to body weight, based on Mishra and Mohanty, 2008) in the water used for the negative controls. Each tank was equipped with a complete filtration system (biological and physical filtration; Zanclus[®], model FBM 155). Filtration and aeration of the tank was performed using a pump with filtration capacity of 650 L per hour (Sarlobetter[®], model Better B650). Sample collection was performed every 15 days, in which 80 L of water from the studied sites was conditioned in plastic bottles and transported to the laboratory. The water in the tanks was partially renewed (1/3, V/V) every 15 days. The samples were collected over 280 days. During exposure, the fish were kept in the same conditions as in the acclimated period. The animal use was approved by Federal University of Santa Catarina Ethic Committee on the Animal Use (CEUA - Process code PP00836).

2.4 Erythrocyte collection

The fish were anaesthetized with a solution of 0.1 g/L benzocaine (Gontijo et al. 2003), and erythrocytes were collected by puncture of the caudal vein using sterilized syringes containing 0.5 mL of 0.5M EDTA at pH 8.0. At each blood collection, we collected blood from two fish per exposition tank. The fish were sacrificed by decapitation after blood collection. The fish erythrocytes were collected in intervals of 28 days, beginning on the 28^o day, subsequently on 56^o, 84^o, 112^o, 140^o, 168^o, 196^o, 224^o, 252^o and finishing on the 280^o day of exposure do river water samples totaling 10 blood extractions per site, over the course of the experiment.

2.5 Micronucleus assay

The erythrocyte samples collected from each fish were smeared on clean slides (two slides per fish), which were dried at room temperature for 30 min and then fixed in 100% methanol for 10 min. Slides were stained with a solution of acridine orange (1 mg/mL) and ethidium bromide (20 µg/mL) (adapted from Hayashi et al. 1990). All slides were analyzed using a blind review by a single observer. Micronuclei exhibiting the same yellow-green fluorescence as the main nucleus were scored in at least 2000 cells/fish under an epi-fluorescent microscope (Olympus® BX40) equipped with an oil-immersion lens at 1000 x magnification.

2.6 Data analysis and statistics

The results were grouped for statistical analysis according to the season of the year, beginning in spring 2010 and finishing in winter 2011. The data used for statistical analysis were the total number of MN for each site in each season. The Tukey paired comparison test was performed to test differences between samples and their respective controls. A significance level of p values less than 0.05 was accepted to indicate statistical significance, using the R software (v2.5.1, R Core Group, 2013).

3. RESULTS

All negative control samples showed a low frequency of MN (0.49 – 0.90%, Table 1). The frequencies of MN observed for the negative control are in agreement with the results obtained in similar studies (Grisolia and Cordeiro 2000; Ergene et al. 2007, Grisolia et al. 2009; Polard et al. 2011a, 2011b). The data obtained in this study are still under the basal level found for other fish species, as seen in the review regarding genotoxic studies using fish held by and Bolognesi and Hayashi (2011).

Blood samples from positive controls (potassium dichromate 2.5 mg/L) had the highest frequency of MN observed in the study period (16.82 – 17.25%, Table 1). These results are in agreement with those verified by Flohr (2011). Potassium dichromate is known to correlate with an increase in generation of clastogenic damages, resulting in micronucleus formation (Normann et al. 2008). Several studies in vivo and in vitro show that compounds containing Cr(VI) are responsible for DNA damage in different ways, either through double-stranded breaks, chromosomal aberrations, micronucleus formation, formation of DNA adducts and alterations in transcription and replication processes

(Zhitkovich et al. 1996; O'Brien et al. 2001; Matsumoto, 2003; Matsumoto and Marin-Morales, 2004; Matsumoto et al. 2006; Yadav and Trivedi, 2006).

When the frequency of MN was grouped by sample station (Fig. 2), almost all samples showed significant differences when compared to the negative control ($p < 0.05$), except for the winter samples for sites 1 and 2. The site 1, located near the headwaters of the Cubatão do Sul River (a location with low anthropogenic interference) showed a significant increase in the frequency of MN compared to negative controls ($p < 0.05$, Fig. 2). The measured MN frequency increased toward the site 4, situated near the river mouth. During the study period, the highest frequency of MN occurred during the summer, for all sampling sites. These results agree with the highest rainfall recorded for the period, according to data from the Information Center of Environmental Resources and Hydrometeorology of Santa Catarina (CIRAM/EPAGRI). Rainfall data (Table 2) were grouped by season, and they represent seven days accumulation prior to the collection of water samples.

Using the site 1 as a reference site with little anthropogenic influence, it was found that the frequency of MN showed significant differences ($p < 0.05$) from the site 4 throughout the study period (Fig. 3).

4. DISCUSSION

Verifying the MN frequency in fish helps us to know the state of water quality, the species health and the potential risk of fish due to a number of chemical substances found in the aquatic environment (Claxton et al. 1998). The frequencies of MN in fish may potentially be used to detect substances that induce clastogenic damages in the aquatic environment, and fish erythrocytes show a high incidence of MN after exposure to different pollutants either in natural conditions or a controlled environment (Rodriguez-Cea et al. 2003).

As regards the locations of the sampling stations, the region bounded by the Cubatão do Sul River is extensively used for horticultural product cultivation, and Águas Mornas city (site 2) is the largest producer of fruits and vegetables from the region (Prefeitura Municipal de Águas Mornas, 2013). Santo Amaro da Imperatriz city presents the highest production of tomatoes and corn (regions near site 3; CEPA, 2012), and the tomato crop requires frequent pesticide application (Latorraca et al. 2008). Castilhos and Oliveira (2000) state that in the region of the Cubatão do Sul River Basin, 95% of the farms

spray their crops with pesticides about five times a week. The high frequencies of MN observed in this study could be induced by chemical compounds present in the pesticides that are used to maintain the cultivation of vegetables and end up being drained to bodies of water by precipitation.

Studies concerning the toxicity of pesticides in fish are scarce (Salvagni et al. 2011), but a few studies have reported the genotoxic potential of these chemicals in fish (Grisolia, 2002; Matsumoto et al. 2006; Çavas and Konen, 2007; Campos-Ventura et al. 2008; Nwani et al. 2010; Çavas, 2011; Pandey et al. 2011). Brazil is the world's largest consumer of pesticides (Carneiro et al. 2012), and the main pesticides used in the Santa Catarina State are Roundup® (glyphosate), Karate® (lambda cyhalothrin), Herbimix® (atrazine and simazine) and Priori Xtra® (azoxystrobin) (Salvagni et al. 2011). Studies show that exposure of fish to glyphosate increases the frequency of micronucleated erythrocytes (Grisolia, 2002). *Carassius auratus* exposed to a concentration of 5 mg/kg glyphosate for 96 h had a MN frequency similar to that observed in this study at site 4 (Çavas and Konen, 2007). Atrazine-based pesticides are commonly found in rivers located near agricultural areas (Vryzas et al. 2011). Exposure of *O. niloticus* to a concentration of 25 g/L atrazine for 72 h induced an increase in MN frequency, 30 times higher than the value observed in the negative control (Campos-Ventura et al. 2008).

The final portion of the Cubatão do Sul River (site 4) is directly affected by effluents from agricultural practices combined with untreated household wastewater. These conditions can alter the integrity of organisms exposed to such contaminants, such as by increasing MN frequency (Lemos et al. 2007). However, these elevated MN frequencies may also reflect other types of diffuse anthropogenic contributions (Lemos et al. 2007). The effluents may contain high amounts of heavy metals such as Cu, Cd, Zn, Cr and Hg, which may affect the aquatic ecosystem (Sampaio et al. 2008, Atli and Canli 2010). Heavy metals are capable of disrupting the integrity of physiological and biochemical mechanisms in fish (Atli and Canli, 2008; Ahmed et al. 2011). Damages on a DNA level represented by micronucleus formation in fish that were exposed to low concentrations of metals are indicative of the accumulation of potentially genotoxic agents (Kligerman, 1982).

The increase of MN frequency observed in this study toward the mouth of the Cubatão do Sul River, at the site with the highest occurrence of water pollution (Fig. 2), is similar to the results reported by Lasheen et al. (2012) in their research using fish as bioindicators for

assessing the impact of effluent discharge on the aquatic environment in Egypt. Similar conditions were also reported by Hughes and Hebert (1991), as they observed an increase in the MN frequency of trout inhabiting polluted sites when compared to trout that inhabited places considered absent of pollution. Bagdonas et al. (2003) detected elevated frequencies of MN in different species of fish collected from polluted sites of the Menušas River in Lithuania. Wirzinger et al. (2007) found a pronounced relationship between domestic effluents and the level of genotoxic damage in *Gasterosteus aculeatus* L.

These observations allow us to suggest that the verification of MN frequency in erythrocytes is a sensitive technique for monitoring water pollution (Ali et al. 2008; Osman et al. 2011). Genotoxic damage observed in erythrocytes of fish exposed in this study can be directly related to the different components of the surface waters of the Cubatão do Sul River such as metals, pesticides, and other organic and inorganic components of this complex mixture.

Linking the increase of MN frequency with the spatial distribution of sampling stations, agricultural practices and runoff in the region, it is evident that during periods of lower rainfall (Table 2), the frequency of MN was lower in all the studied sites. Weeks with little or no rainfall, a condition observed in winter 2011, may result in a runoff decrease, resulting in less pollution of bodies of water (Polard et al. 2011b). In periods of high rainfall (recorded during summer 2011 for the drainage basin for the Cubatão do Sul River) there was a runoff increase, and therefore an increase in the drift of potentially toxic materials into the river waters, leading to an increase in the factors that influence the metabolic processes responsible for a change in MN frequency (Polard et al. 2011b).

Galindo and Moreira (2009) investigated the seasonal variation of climatic conditions and their relationship to the frequency of MN, and found several variations associated with precipitation and an elevation in MN frequency. In the rainy months, with increased runoff, impurities were drained to the river, reflecting the MN frequency increase. Bresler et al. (2001) found seasonal differences in the MN frequency in *Tilapia zilli* and *Cyprinus carpio* exposed to Yarqon River (Israel) water samples collected during the rainy season. The increase in the frequency of MN was induced by runoff of silt, garbage and chemicals present in the soil containing genotoxic and clastogenic compounds. Therefore, the increases of MN frequency observed in our study may be an expression of seasonal effects, but can also be linked to runoff from agricultural areas. Runoff is recognized as a major source of pollutants to surface

waters (Kayhanian et al. 2007). Places that receive discharge of effluents from agricultural and household areas are not only affected by water pollution but also by changes in the aquatic ecosystems and the consequent genotoxic effects that may affect the fish (Omar et al. 2012).

The present study verified the genotoxic nature of water samples from the Cubatão do Sul River, suggesting that local aquatic ecosystems may be under stress due to agricultural and domestic effluents. No chemical analyses were performed to determine the composition and concentration of water samples from the river because this study aimed to evaluate the effect of complex environmental mixtures on fish. However, we can hypothesize that the damage resulting from the observed increase in MN frequency was induced by genotoxic substances originating from agricultural runoff and domestic effluents released without treatment, based on evidence from literature data and public information in the region.

5. CONCLUSIONS

Pollution of aquatic environments, especially surface water from rivers that have potentially genotoxic substances, is a critical problem. Application of the micronucleus test, designed to verify the genotoxic and mutagenic potential of the surface waters of the Cubatão do Sul River, showed to be an effective tool for the verification of such conditions because the results indicate the genotoxic potential of these waters. Further research into the components responsible for generating these genotoxic effects is recommended for this environment, as well as the performance of genotoxicity tests using other environmentally representative organisms. The water samples collected from the Cubatão do Sul River during the different periods of this research are complex environmental mixtures of inorganic and organic compounds that consist of thousands of individual components that can interact in an additive, synergistic or antagonistic way; furthermore, the results of this study reveal biological data from areas exposed to multiple sources of pollutants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil). We would like to thank Piscicultura Panamá, (Paulo Lopes – SC, Brazil), for providing the fish used in this study.

SUPPLEMENTAR MATERIAL

As supplementary material we present the concentration for heavy metals, organic compounds and pesticides in surface waters from a monitored site by the local water treatment and sanitation utility located downstream the site 3 on Cubatão do Sul River (Table S1). We also supply a Table (Table S2) containing the mean values from physico-chemical and biologic parameters from these same site for the period of the study (spring 2010 – winter 2011). These data were provided from the local water treatment and sanitation utility (CASAN).

Conflicts of interest

The authors declare that they have no direct financial relationships with Zanclus[®], SarloBetter[®], Olympus[®], Roundup[®], Karate[®], Herbimix[®] or PrioriXtra[®] and that there are no conflicts of interest.

6. REFERENCES

- Ahmed, Md. K., Md. Habibullah-Al-Mamun, Hossain, M. A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M. S., Khan, M. S., Islam, Md. M. 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, 84, 143-149.
- Al-Sabti, K. 1995. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutat. Res.* 335, 109-120.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343, 121-135.
- ANA (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS). 2005. Brasil. Panorama da Qualidade das Águas Superficiais no Brasil. *Cadernos de Recursos Hídricos*.
- Atli, G., Canli, M. 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 33-38.
- Atli, G., Canli, M. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1884-1889.
- Ali, F. K., El-Shehawi, A. M., Seehy, M. A. 2008. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 606-612.
- Bagdonas, E., Dukelskis, E., Lazutka, J. 2003. Frequency of micronucleated erythrocytes in wild fish from natural freshwater body. *Ekologija*, 1, 67-71.

- Bolognesi, C., Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*. 26, 205-213.
- Bresler, V. M., Fishelson, L., Abelson A. 2001. Determination of primary and secondary responses to environmental stressors and biota health, In: I. Linkov, J. Palma-Oliveira (Eds.), *Assessment and Management of Environmental Risks*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 57–70.
- Burriss, R M, 1975. Development and evaluation of onsite toxicity test procedure for fishery investigation. U S Department. Fish. Wild. Serv. Wash., 68:1-8.
- Campana, M. A., Panzeri, A. M., Moreno, V. J., Dulout, F. N. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genet. Mol. Biol.*, 26, 99-104.
- Campos-Ventura, B., De-Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90, 42–51.
- Carneiro, F., Pignati, W., Rigotto, R. M., Augusto, L. G. S., Rizzolo, A., Muller, N. M., Alexandre, V. P., Friedrich, K., Mello, M. S. C. 2012. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar, Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.abrasco.org.br/UserFiles/Image/_Dossie%20abrasco%20por%20t.pdf. Acesso em março de 2013.
- CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Abastecimento). 2013. Expedição ao Rio Cubatão. Disponível em: <http://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/expedicao-ao-rio-cubatao#0> Acesso em dezembro de 2012.
- Castilhos JR, A. B., Oliveira, F. B. 2000. Diagnóstico de produtos residuários do uso de agrotóxicos utilizados na bacia hidrográfica do Cubatão do Sul - BHCS/SC. *Agropecuária Catarinense*, Santa Catarina. 13, 48-51.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264-271.
- Çavas, T., Konen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*. 22, 263–268.

- Çavas, T. 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431–1435.
- CEPA (Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola). 2012. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina, 2011 – 2012. Available on: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2012/sintese%202012.pdf Acesso em janeiro de 2013.
- Claxton, L.D., Houk V.S., Hughes T.J. 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410, 237–43.
- Cristaldi, M., Ieradi, L. A., Udroui, I., Zilli, R. 2004. Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutat. Res.* 559, 1-9.
- Ergene, S., Çavas, T. Çelik, A. Köleil, N., Aymak, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. 2007. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 421-429.
- Fleeger J. W., Carman K. R., Nisbet R. M. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317, 207-233.
- Flohr, L. 2011. Aplicação e validação do modelo WTox para avaliar risco ambiental toxicológico de misturas complexas: estudo de caso em amostras de resíduos industriais. Florianópolis, SC, 255 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
- Flora, S., Bagnasco, M., Znacchi, P., 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutat. Res.* 258, 285–320.
- Galindo, T. P., Moreira, L. M. 2009. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet. Mol. Biol.* 32, 394-398.
- Gontijo, A. M. M. C., Barreto, R. E., Speit, G., Reyes, V. V. A., Volpato, L. G., Salvadori, D. M. F. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat. Res.* 534, 165-172.
- Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish, *Genet. Mol. Biol.* 23, 235–239.
- Grisolia, C.K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat. Res.* 518, 145-150.

- Grisolia, C. K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., da Silva, I.C.R., Barbosa, A.C., Jose G. Dorea, J.G. 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.* 32, 138-143.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. Ishidate, M. J. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange-coated slides. *Mutat. Res.* 245, 245-249.
- Hughes, J.B. and Hebert, A. T. 1991. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 20, 474-479.
- Kaiser, J. Oliveira, M., Zotz, W. 2012. In: Atlas de Santa Catarina. 3ª ed. Editora Letras Brasileiras. Florianópolis/SC. 123p.
- Kayhanian M, Suverkropp C, Ruby A and Tsay K. 2007. Characterization and prediction of highway runoff constituent event mean concentration. *J. Environ. Manag.* 85, 279-295.
- Kligerman, D. 1982. Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents. In: J. Heddle (Ed.) *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, New York, USA, p. 435-456.
- Lah, B., Vidic, T., Glasencnik, E., Cepeljnik T., Gorjanc G., Marinsek-Logar, R. 2008. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environ. Monit. Assess.* 139, 107-118.
- Lakra, W. S., Nagpure, N. S. 2009. Genotoxicological studies in fishes: a review. *Indian J. Anim. Sci.* 79, 93-98.
- Lambalez, L., Vasseur, P., Ferard, J.F., Gisbert, T. 1993. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28, 317-328.
- Lasheen, M. R., Abdel-Gawad, F. K., Alaneny, A. A. and Abd El bary, H. M. H. 2012. Fish as Bio Indicators in Aquatic Environmental Pollution Assessment: A Case Study in Abu-Rawash Area, Egypt. *World Appl. Sci. J.*, 19, 265-275.
- Latorraca A., Marques G., Sousa K., Fornés N. 2008. Pesticides used in tomato production in Goiânia and Goianópolis and their effects on human health. *Ciências Saúde.* 19, 365-374.
- Lemos, C.T., Erdtmann, B., 2000. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutat. Res.* 467, 1-9.
- Lemos, C. T., Rödel, P. M, Terra, N. R. Oliveira, N. C. D., Erdtmann, B. 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 391-401.

- Martins, R. P., Melo Filho, E., Franco, D. Circulação hidrodinâmica e dispersão de poluentes na Baía de Florianópolis. Relatório, 1997.
- Matsumoto, F.E., Cólus, I.M.S. 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet. Mol. Biol.* 23, 489–492.
- Matsumoto S. T. 2003. Efeitos tóxicos e genotóxicos de metais pesados, especificamente do cromo trivalente e hexavalente. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.
- Matsumoto S. T., Marin-Morales M. A. 2004 Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. *Cytologia* 69, 399-408.
- Matsumoto, S.T., Mantovani M.S., Malagutti M.I.A., Dias A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales M.A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.* 29, 148-158.
- Mishra, A., Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 136-141.
- Normann, C. A. B. M., Moreira, J. C. F., Cardoso, V. V. 2008. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecostomus* exposed to potassium Dichromate. *Afr. J. Biotechnol.*, 7,893-896.
- Nwani C.D., Lakra W.S., Nagpure N.S., Kumar Ravindra, Kushwaha B., Srivastava S. K. 2010 Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single cell gel electrophoresis, *Food Chem. Toxicol.*, 48, 202-208.
- O'Brien T., Xu J., Patierno S. R. 2001. Effects of glutathione on chromium-induced DNA crosslinking and DNA polymerase arrest. *Mol. Cell. Biochem.* 222, 173-182.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567, 109–149.
- Omar, W. A., Zaghoul, K. H., Abdel-Khalek, A. A., Abo-Hegab, S. 2012. Genotoxic effects of metal in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat. Res.* 746, 7-14.

- Osman, Alaa G. M., Abd El Reheem, Abd-El-Baset M., Moustafa, Mohsen A., Mahmoud, Usama M., Abuel-Fadl, Khaled Y. and Kloas, Werner. 2011. In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: I. Micronucleus and nuclear lesion tests of erythrocytes of *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), *Toxicol. Environ. Chem.* 93, 1002 – 1017.
- Pantaleão, S. M., Alcântara, A. V., Alves, J. P. H., Spanó, M. A. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Jarapatuba River in Brazil. *Environ. Mol. Mutagen.* 47, 219-224.
- Pandey A. K., Nagpurea N.S., Trivedi S. P., Kumar R., Kushwaha B. 2011, Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis, *Mutat Res/Genetic Toxicol Environ Mut* 726, 209-214.
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J. M., Pinelli, E. 2011a. Mutagenic impact on fish runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquat. Toxicol.* 101, 126-134.
- Polard, T., Jean, S., Merlina, G., Laplanche, C., Pinelli, E. Gauthier, L. 2011b. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 144-149.
- Prefeitura Municipal de Águas Mornas, 2013. Disponível em: <http://www.aguasmornas.sc.gov.br/historico.htm>. Acesso em janeiro de 2013.
- Reifferscheid G., Grummt T. 2000. Genotoxicity in German surface waters – results of a collaborative study. *Water Air Soil Pollut.* 123, 67-79.
- Rocha, P. S., Luvizotto, G. L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H. 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1842-1848.
- Rodriguez-CeaA, F. Ayllon and Garcia-Vazquez, E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: An evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 442-448.
- Salvagni, J., Ternus, R. Z., Fuentefria, A. M. 2011. Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil *Gen. Mol. Biol.* 34, 122-126.
- Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in

- pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 43–51.
- Schulze, L. D., Ogg, C., Vitzthum, E. F. 1997. EC97-2505 Signs and Symptoms of Pesticide Poisoning. Historical Materials from University of Nebraska – Lincoln Extension. Paper 1225. Available on: <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/1225> Acesso em dezembro de 2012.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313, 1072–1077.
- Souza, R. T. 2006. Uso de Equipamentos de Proteção Individual na Pulverização de Videiras. Porto Alegre: EMBRAPA, 2006, p. 8 -10. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br> > Acesso em fevereiro de 2012.
- Summak S., Aydemir, N. C., Vatan O., Yılmaz D., Zorlu T., Bilalog R. 2010. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2443–2447
- Tagliari, K.C., Cecchini, R., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2004. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat. Res.* 561, 101–107.
- Taherianfard, M., Ebrahimi M., Soodbakhsh, S. 2008. Bioaccumulation of Mercury in Fishes of Kor River. *Austr. J. Bas. Appl. Sci.* 2, 904-908.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201–204.
- Vargas, V.M.F., Migliavacca, S.B., Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R., Ferreira, I.C.F.S., Pestana, M.H.D. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.* 490, 141 158.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Viganò, L., Camoirano, A., Izzotti, A., D’Agostini, F., Polesello, S., Francisci, C., De Flora, S., 2002. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutat. Res.* 515, 125–134.
- Vryzas, Z., Alexoudis, C., Vassiliou, G., Galanis, K., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2011. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 174–181.

White, P. A., Rasmussen, J. B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410, 223-236.

White, P. A. 2004. The sources and potential hazards of mutagens in complex environmental matrices. *Mutat. Res.* 567, 107-108.

Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J. and Sordyl, H. 2007. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool. *Mutat. Res.* 628: 19-30.

Yadav K.K., Trivedi S. P. 2006. Evaluation of Genotoxic Potential of Chromium (VI) in *Channa punctata* fish in terms of Chromosomal Aberrations, *Asian Pacific J. Cancer Prevention*, 7, 472-476.

Zhitkovich A., Voitkun V. and Costa M. 1996. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: Importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochem.* 35, 7275-7282.

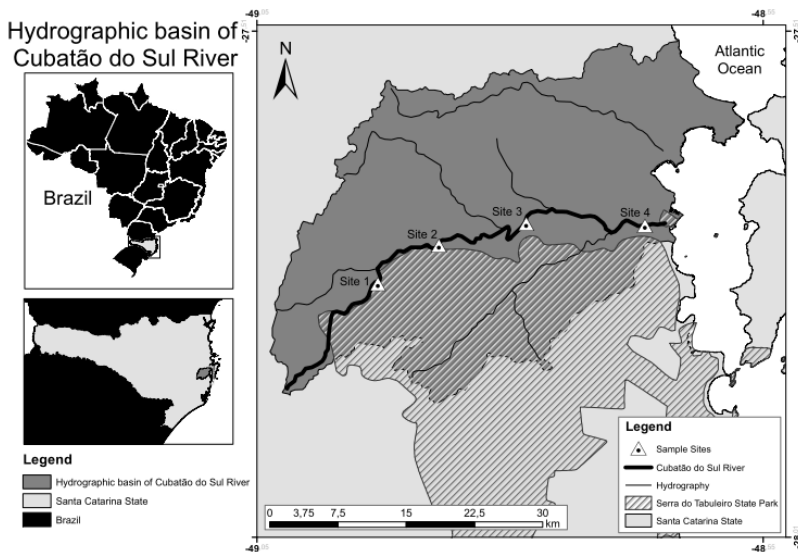


Fig. 1: Hydrographic basin of the Cubatão do Sul River in southern Brazil and spatial distribution of sampling sites of water samples.

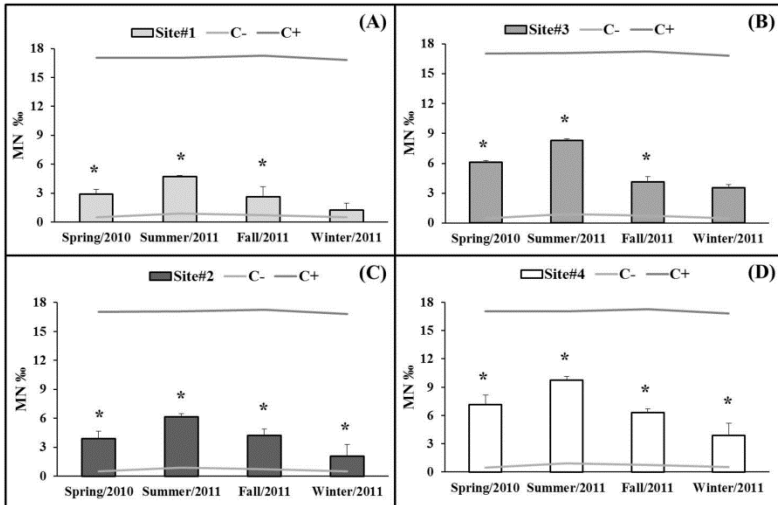


Fig. 2: Spatial distribution of MN frequency (%) \pm SD observed in *O. niloticus* exposed to surface waters from the Cubatão do Sul River from spring 2010 - winter 2011. (A) Site 1, near the headwater of the Cubatão do Sul River. (B) Site 2, near the city of Águas Mornas. (C) Site 3, near the city of Santo Amaro da Imperatriz, (D) Site 4, near the mouth of the Cubatão do Sul River. C-: negative control. C+: positive control * $p < 0.05$ indicates a significant difference between the samples and negative controls.

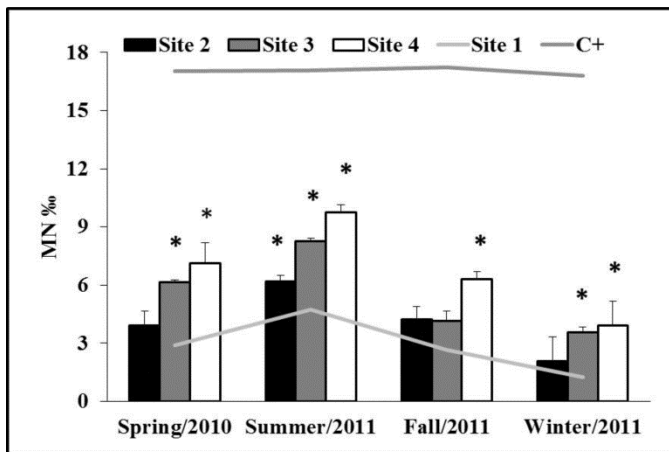


Fig. 3: Spatial distribution of MN frequency (%) \pm SD, observed in *O. niloticus* exposed to surface waters from the Cubatão do Sul River from spring 2010 - winter 2011, with site 1 (near the headwater of Cubatão do Sul River) as a reference local. * $p < 0.05$ indicates a significant difference between the samples and site 1.

Table 1: Number of micronucleated erythrocytes observed in *O. niloticus* exposed to the surface waters of the Cubatão do Sul River over the course of 280 days (spring 2010 - winter 2011). Positive control: potassium dichromate 2.5 mg/L.

Samples		Total cells	Total number of MN counted	%MN \pm SD
Season				
Negative control	Spring 2010	12219	11	0.49 \pm 0.26
	Summer 2011	12200	6	0.90 \pm 0.01
	Fall 2011	12091	9	0.75 \pm 0.43
	Winter 2011	12099	6	0.50 \pm 0.25
Site 1	Spring 2010	12245	35	2.89 \pm 0.51
	Summer 2011	12120	58	4.74 \pm 0.12
	Fall 2011	12093	32	2.65 \pm 1.01
	Winter 2011	12095	15	1.24 \pm 0.75
Site 2	Spring 2010	12143	47	3.91 \pm 0.76
	Summer 2011	12029	75	6.18 \pm 0.31
	Fall 2011	12116	51	4.21 \pm 0.66
	Winter 2011	12066	25	2.07 \pm 1.25
Site 3	Spring 2010	12231	75	6.13 \pm 0.15
	Summer 2011	12080	100	8.28 \pm 0.16
	Fall 2011	12077	50	4.14 \pm 0.52
	Winter 2011	12067	43	3.56 \pm 0.29
Site 4	Spring 2010	12059	86	7.13 \pm 1.04
	Summer 2011	12088	118	9.76 \pm 0.36
	Fall 2011	12068	76	6.30 \pm 0.39
	Winter 2011	12064	47	3.89 \pm 1.26
Positive control	Spring 2010	12202	208	17.05 \pm 0.26
	Summer 2011	12193	208	17.06 \pm 0.55
	Fall 2011	12114	209	17.25 \pm 0.34
	Winter 2011	12068	203	16.82 \pm 0.18

Table 2: Accumulated rainfall in the region of Cubatão do Sul River from spring 2010 – winter 2011.

Accumulated rainfall ¹ (mm)				
Season	Sampling stations			
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
Spring	189.1	156.8	196.9	146.1
Summer	339.0	374.6	506.0	449.5
Fall	96.1	139.6	146.2	140.1
Winter	82.5	133.3	194.4	126.8

Table S1: Concentration of heavy metals and organic compounds in surface water from Cubatão do Sul River measured on the monitored site of the local water treatment sanitation utility (CASAN) located downstream site 3.

	Parameter	[]	D. L. ²	Method
Heavy Metals ¹	Aluminum	1.28 mg Al.L ⁻¹	0,01	3030F e 3120B ³
	Barium	0.0215 mg Ba.L ⁻¹	0,0002	3030F e 3120B ³
	Copper	0,0017 mg Cu.L ⁻¹	0,0005	3030F e 3120B ³
	Iron	2,66 mg Fe.L ⁻¹	0,006	3030F e 3120B ³
	Manganese	0,1680 mg Mn.L ⁻¹	0,0002	3030F e 3120B ³
	Zinc	0,065 mg Zn.L ⁻¹	0,002	3030F e 3120B ³
Organic compounds and pesticides ¹	Acrylamide	<0,1 µg.L ⁻¹	0,1	EPA 8032-A ⁴
	Glyphosate	<50 µg.L ⁻¹	50	EPA 547 ⁵
	2,4-D	<10 µg.L ⁻¹	10	EPA 8270-D ⁶
	Alachlor	<1,0 µg.L ⁻¹	1	EPA 8270-D ⁶
	Aldrin and Dieldrin	<0,01 µg.L ⁻¹	0,01	EPA 8270-D ⁶
	Atrazine	<0,2 µg.L ⁻¹	0,2	EPA 8270-D ⁶
	Bentazone	<1,0 µg.L ⁻¹	1	EPA 8270-D ⁶
	Benzo-a-pyrene	<0,01 µg.L ⁻¹	0,01	EPA 8270-D ⁶
	DDT	<0,5 µg.L ⁻¹	0,5	EPA 8270-D ⁶
	Endrin	<0,5 µg.L ⁻¹	0,5	EPA 8270-D ⁶
	Heptachlor	<0,03 µg.L ⁻¹	0,03	EPA 8270-D ⁶
	Metolachlor	<1,0 µg.L ⁻¹	1	EPA 8270-D ⁶
	Pentachlorophenol	<5,0 µg.L ⁻¹	5	EPA 8270-D ⁶

¹ Data referent of one single water analyses from Cubatão do Sul River performed on February 2010. Source: CASAN.² Detection limit³ APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION) 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. Washington.⁴ EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 1996. Method 8032-A. Acrylamide by Gas Chromatography.⁵ EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 1990. Method 547. Determination of Glyphosate in drinking water by direct-aqueous injection HPLC, post-column derivatization and fluorescence detection.⁶ EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 2007. Method 8270-D. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

Table S2: Mean concentration of physico-chemical and biological parameters in surface water from Cubatão do Sul River measured on the monitored site of the local water treatment sanitation utility (CASAN) located downstream site 3.

Parameters ¹	Spring 2010	Summer 2010	Fall 2010	Winter 2010
pH	6.81	6.70	6.92	6.68
OD (mg/L)	8.31	6.86	8.42	8.58
Alkalinity (mg/L CaCO ₃)	13.58	13.25	13.79	15.33
Total Hardness (mg/L as CaCO ₃)	23.58	12.17	20.34	23.10
Colour (mg/L PtCo)	47.50	110.00	42.36	67.25
Turbidity (NTU)	9.29	29.23	7.51	19.92
Total Solids (mg/L)	-	671.00	269.50	228.50
Nitrite ² (mg/L)	-	0.01	0.01	0.00
Nitrate ² (mg/L)	-	1.54	0.00	0.00
Ammonia ² (mg/L)	-	0.72	0.28	0.04
Total phosphorous ² (mg/L)	-	0.45	0.11	0.00
Chloride ² (mg/L)	21.12	11.57	21.25	22.75
Iron ² (mg/L)	0.62	1.74	0.56	0.50
Aluminium ² (mg/L)	0.14	0.05		0.02
Sulfate ² (mg/L)	-	1.00	1.25	9.00
Sulfide ² (mg/L)	-	0.04	0.04	0.04
Total Coliforms ² (NMP/100mL)	1,732.87	16,428.00	16,973.83	7,668.67
Fecal Coliforms ² (NMP/100mL)	382.33	3,022.79	2,061.61	1,235.37

¹ Data referent from the mean of the parameters from water samples of Cubatão do Sul River in a monitored site located downstream site 3. Source: CASAN.

² APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION) 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. Washington.

A2. Dados de chuva (mm)

Dados de chuva acumulada (mm) registrada nas diferentes datas de coleta das amostras de água do Rio Cubatão do Sul nos pontos de coleta de água.

	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3		Ponto 4	
	Data	Total acumulado (mm) ¹	Data	Total acumulado (mm) ¹	Data	Total acumulado (mm) ¹	Data	Total acumulado (mm) ¹
Primavera 2010	04/nov	39	04/nov	35	02/nov	63,9	02/nov	42,8
	15/nov	9,3	15/nov	17,5	17/nov	45,4	14/nov	8,1
	29/nov	93,7	29/nov	55,7	29/nov	44,3	30/nov	57,9
	06/dez	47,1	06/dez	50,8	06/dez	43,3	06/dez	37,3
	Total	189,1	Total	159	Total	196,9	Total	146,1
Verão 2011	29/dez	31,4	29/dez	31	29/dez	58,8	28/dez	56,3
	08/jan	45	13/jan	90,3	08/jan	54,1	08/jan	21,5
	25/jan	139,9	28/jan	161,6	28/jan	185,7	28/jan	178,5
	05/fev	56,4	09/fev	43	09/fev	97	09/fev	43,7
	22/fev	48,8	21/fev	40,2	24/fev	93,1	27/fev	104,5
	07/mar	17,5	08/mar	8,5	08/mar	17,3	10/mar	45
	Total	339	Total	374,6	Total	506	Total	449,5
Outono 2011	27/mar	9,7	27/mar	16	27/mar	21,4	29/mar	31,2
	12/abr	8	12/abr	11,9	16/abr	23,7	16/abr	22,5
	29/abr	13,9	29/abr	12,1	28/abr	12,9	28/abr	6,2
	17/mai	47,4	17/mai	71,9	17/mai	61,7	19/mai	56,5
	08/jun	17,1	08/jun	27,7	09/jun	26,5	09/jun	23,7
	Total	96,1	Total	139,6	Total	146,2	Total	140,1
Inverno 2011	26/jun	23,6	26/jun	54,8	26/jun	15,6	26/jun	47,5
	09/jul	14,2	09/jul	25,6	09/jul	31,8	09/jul	13,7
	27/jul	26,4	27/jul	42,5	27/jul	21,7	27/jul	38
	08/ago	18,3	14/ago	10,4	16/ago	71	16/ago	27,6
	Total	82,5	Total	133,3	Total	140,1	Total	126,8

¹. Total acumulado referente à soma dos 7 dias anteriores a cada coleta das amostras de água.

A3. Artigo 2

Effects of oxidative stress and hypermethylation induced by exposure of *Oreochromis niloticus* to complex environmental mixtures of river water of Cubatão do Sul (Santa Catarina / Brazil)

Será submetido à Revista Científica “Chemosphere”

Cristiane Funghetto Fuzinato^a, Letícia Flohr^a, Sílvia Pedroso Melegari^a and William Gerson Matias^{a,*}

^aLaboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.

* Corresponding author: Prof. William Gerson Matias at Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brasil. Telephone number: + 55 48 3721-7742; Fax number: +55 48 3721-9823. E-mail address: william.g.matias@ufsc.br

ABSTRACT

In this study, we investigated effects of oxidative stress and hypermethylation through lipid peroxidation and DNA methylation, respectively, in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to environmental complex mixture of water from Cubatão do Sul River, during the seasons of the year. Lipid peroxidation was quantified by the rate of malondialdehyde (MDA) and DNA methylation was quantified by the rate of 5-methyldeoxycytosine (m⁵dC). In all studied sites the river water samples caused metabolic changes in *O. niloticus*. MDA rates were significantly different when comparing samples with the negative control (exception for samples from site 1 during spring 2010, summer 2011 and fall 2011). All samples (exception site 1, spring 2010) induced increases in the m⁵dC rates, and at the end of the study the values were very close to the values found on the positive control. The results showed that samples of environmental complex mixture of water from Cubatão do Sul River are capable of inducing high levels of oxidative damage and hypermethylation in *O. niloticus*.

Keywords: Lipid peroxidation, DNA methylation, river water, *Oreochromis niloticus*.

1. INTRODUCTION

Runoff from agricultural and urban areas is responsible for much of the load of genotoxic compounds found in surface river water (White and Rasmussen, 1998). The river water is composed of a mixture form numerous chemical compounds, organic or inorganic, many potentially genotoxic and mutagenic. Chemical compounds with mutagenic potential are present in a variety of complex environmental mixtures including drinking water, surface water, aquatic sediments, soil and atmosphere (White, 2004; Erickson et al., 2008). According to information from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2010), river contamination by domestic, agricultural and industrial sewage, has generated lack on the availability of water quality even in areas with abundant water resources, and generate increased in the cost of treating water for human supply.

All rivers on the central coast of Santa Catarina State (southern Brazil) present some degree of pollution, mainly from domestic and industrial effluents, solid waste, pesticides (ANA, 2005). The hydrographic basin of the Cubatão do Sul River is the most alarming because of its water supply importance for about 700,000 people (CASAN, 2013). According to the local water treatment and sanitation utility (CASAN, 2013), in recent years, the Cubatão do Sul River has suffered significant bank erosion with the removal of riparian vegetation; as a consequence, this loss has contributed to a decrease in water volume over the years. Moreover, in the Cubatão do Sul River basin, there is widespread cultivation of vegetables and cattle, and these activities, along with the removal of riparian vegetation, domestic sewage runoff and sand mining, are degrading the borders and the quality and quantity of its waters (Martins et al., 1997). Micropollutants from agricultural and domestic effluents, even at low concentrations, may interact synergistically or antagonistically, and the combination of these effects cannot be predicted by chemical analysis. Therefore, toxicological studies are essential for identifying these effects (Lambolez et al., 1993; Van der Oost et al., 2003; Schwarzenbach et al., 2006).

According to US Geological Survey (USGS, 2010), data relating to water contamination by agricultural and domestic effluents are really worrying because organochlorines, DDT and pesticides can be detected in water bodies over 20 years after being used.

Fish are important tools utilized as bioindicators for the detection of water contamination by substances potentially toxic (Sharma and Singh, 2004; 2006). Fish can accumulate pollutants by direct contamination by chemicals present in the water, or indirectly through ingestion of organisms that accumulate pollutants (Al-Sabti, 1995). The genre *Oreochromis* has been widely used in studies of genotoxic, epigenetic, oxidative stress and environmental monitoring (Çavas and Ergene-Gözükar, 2003, 2005; Flohr, 2012; Grisolia and Cordeiro, 2000; Grisolia et al., 2009, Grisolia and Starling, 2001; Souza and Fontanetti, 2006).

The consequences of oxidative stress in aquatic organisms caused by continuous exposure to potentially toxic compounds can be exemplified through the early mutations, accelerated aging of cells, difficulty in adapting to environmental changes and carcinogenesis (Reiffescheid and Grummt, 2000). Oxidative stress is induced by several chemical compounds and these contaminants can stimulate the production of reactive oxygen species (ROS), which due to its high reactivity can cause oxidative damage to important molecules formation and cellular function, causing changes in the antioxidant defense system of the bodies (Hermes-Lima, 2004; Wilhelm Filho, 2007; Lushchak, 2011; Kadry et al., 2012). The occurrence of oxidative stress in the aquatic organisms can be verified by the measuring of the malondialdehyde (MDA). MDA is a marker of environmental exposure to xenobiotics that induce oxidative damage, MDA is one of the latter products released in the process of lipid peroxidation, and can be detected both in vitro and in vivo (Esterbauer et al., 1991; Matias and Creppy, 1998a). Lipid peroxidation (LPO) is described as a chain reaction between molecular oxygen and polyunsaturated fatty acids of membrane phospholipids. It is a reaction of auto-oxidation spoiling polyunsaturated lipids (Matias and Creppy, 1998a). The LPO is considered the leading cause of oxidative damage and cell death (Hermes-Lima, 2004).

Changes caused by xenobiotics with peripheral systems, inducing changes in the biological synthesis able to alter the biochemistry of DNA are called epigenetic and can be studied by DNA methylation (Baccarelli and Bollati, 2009). Epigenetic modifications involve changes in gene expression without changing the DNA sequence (Aluru et al., 2011). DNA methylation is the transfer of methyl groups from S-adenosylmethionine (SAM, a cofactor enzyme present in all eukaryotic cells) to position 5 of cytosine is catalyzed by enzymes known as DNA methylase. (Kulis and Esteller, 2010). The m⁵dC represents 2 to 5% of all cytosines present in the genome of mammals (Millar et al., 2003).

The addition of the methyl group is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs), with high levels of methylation are associated with the suppression of the genes leading to the generation of deformities and in some cases mortality (Aluru et al., 2011). The hypermethylation of DNA involves genes that are directly related to apoptosis, metastasis, DNA repair cycle and is reported in numerous cases where the incidence of cancer is investigated (Esteller et al., 2001; Gronback et al., 2007).

Based on suggested above about the presence of contaminants in the river water, the objectives of this study were to evaluate the risks of chronic exposure of fish to environmental complex mixture of river water from Cubatão do Sul river, an important source of funding water for human consumption, by evaluating the LPO with the quantification of MDA and verification of biological methylation of DNA by quantifying m5dC in *Oreochromis niloticus*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area

The Cubatão do Sul River belongs to the Hydrographic Basin of Cubatão do Sul River and is located in southern Brazil, in the central coast of the Santa Catarina State, between parallels 27°35'46"S and 27°52'50"S and longitudes 48°38'24"W and 49°02'24"W. This river is 65 km long and bathes an area of 738 km². This river is used as water supply of part of Florianópolis city (capital of Santa Catarina State) and its metropolitan area (cities of Santo Amaro da Imperatriz, São José, Palhoça and Biguaçu), serving a population of approximately 700,000 inhabitants (Fig. 1). According to the Santa Catarina Atlas (Kaiser et al., 2012), a distribution of rain occurs throughout the year. The months with the largest precipitation are: January, February and March. While the months of lower rates are May and June. The water samples were collected from four different sites of Cubatão do Sul River (Fig. 1): upper Cubatão do Sul River (site 1), in the vicinity of Águas Mornas city (site 2), in the vicinity of Santo Amaro da Imperatriz city (site 3), and lower Cubatão do Sul river (site 4). Water samples collection was performed every 15 days, where about 80 L of water from the studied sites, were conditioned in plastic bottles and transported to laboratory. Water samples were collected during 280 days, beginning in Spring 2010 and finishing in Winter 2011.

2.2. Test organisms

In this study 132 *O. niloticus* fish (Perciformes: Cichlidae) (weight = 31.5 ± 0.5 g, length = 11 ± 2 cm) were used. Fish were acclimated for a period of 15 days in 1.000 L aerated tanks, with chlorine-free water,

and diffuse light (photoperiod of 16h) and at $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The organisms were fed every 48 h with food for juvenile fish (Peixe Juvenil, Aqua Line, Supra, RS, Brazil) containing 42 % of protein and 500 mg/kg of vitamin C. The remains of uneaten food and fecal material were removed from storage tanks, and water was renewed every 48 h.

2.3. Fish exposure assays

After acclimation period, fish were subdivided randomly in groups of 22 organisms. Each group was kept in tanks of 130 L with water collected from site 1, 2, 3 and 4 of Cubatão do Sul River (Fig. 1). As a negative control we used mineral water collected from the fountain Caldas, located at Santo Amaro da Imperatriz. As positive control, two fish were exposed every 48 h earlier the blood extraction to a concentration of 2.5mg/L of potassium dichromate (sub lethal concentration of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ adapted to body weight, based on Mishra and Mohanty, 2008) that was diluted on water (negative control). Each tank was equipped with a complete filtration system (biologic and physical filtration; Zanclus®, model FBM 155). Filtration and aeration of the tank was performed using a pump with filtration capacity of 650 L per hour (SarloBetter®, model Better B650). Samples collection was performed every 15 days, where 80 L of water from the studied sites, were conditioned in plastic bottles and transported to laboratory. The water of the tanks has been partially renewed (1/3, V/V) each 15 days. The samples were collected during 280 days. During the exposure, the fish were kept in the same conditions of acclimated period. The animal use was approved by the local ethics committee on the animal use (CEUA, PP00836).

2.4. Erythrocytes collection

The fish were anaesthetized with a solution of benzocaine 0.1 g/L (Gontijo et al., 2003), and erythrocytes were collected by puncture of the caudal vein using sterilized syringes containing 0.5 mL of 0.5M EDTA pH 8.0. At each blood collection we collected blood from two fish per exposition tank. The fish were sacrificed by decapitation after blood collection. The fish erythrocytes were collected in intervals of 28 days, totalizing 10 blood extractions per site, during the all experiment.

2.5. LPO measured by MDA quantification

LPO test was performed according to Flohr et al., (2012). Centrifugation of 200 μL aliquots of fish erythrocytes were carried at 2000g for 10 min, and the plasma obtained after centrifugation was used for tests. 100 μL of plasma was collected from each sample and then was added 150 μL of SET buffer pH 8.0. The samples were homogenized using a vortex and 20 μL of this homogenate was removed

to measure protein content. A calibration curve was prepared with eight dilutions of standard MDA ranging from 7.5 to 6×10^7 nM. The following reagents were added to the MDA standards and to plasma samples: 25 μ L SDS 7% (w/v), 300 μ L HCl 0,1M, 40 μ L phosphotungstic acid (w/v) and 300 μ L thiobarbituric acid 0.67 % (w/v). After vortex mixing, the tubes were incubated at 90°C for one hour in the dark and placed on ice bath (0°C) for 15 minutes. Subsequently a volume of 300 μ L of n-butanol was added to each sample and the tubes were vigorously mixed by vortex. Then, the tubes are centrifuged at 3000g for 10 minutes. The n-butanol phase containing the complex MDA-TBA was separated and quantified using HPLC (HP-1050 HPLC System) with a Supelcosil LC-18 Column (250 x 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase was methanol-water, 40:60 (v/v), pH 8.4. The flow was 0,5mL/min and the injection volume was 20 μ L. The wavelengths of excitations and emission were 515 and 553nm, respectively (Programmable Fluorescence Detector HP1064A). The MDA-TBA was measured by relating the content of protein cell homogenate using the colorimetric method of Bradford (1976).

2.6. DNA methylation measured by m⁵dC rates.

DNA methylation test was carried out based on (Bardakci and Sibinski, 1994; Perreault et al., 2011, Flohr, 2012), with modifications. 200 μ L of blood were centrifuged and the pellet formed was resuspended with 400 μ L of lysis buffer (1M Tris HCl pH 7.4, 1M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS, MiliQ water). 10 μ L of proteinase K were added and the samples were keep in a water bath at 45°C for 2 hours. Subsequently, the DNA was purified with one extraction with phenol, one extraction with phenol:chloroform and one extraction with chloroform. DNA was precipitated with cold isopropanol and incubated at 20°C overnight. Then, DNA was washed with 500 μ L of ethanol 70%, and after air drying, the pellet was resuspended in 50 μ L of MiliQ water. 5 μ L RNase was added and left at room temperature overnight. DNA purity was quantified by the ratio between the absorbance at 260 and 280nm. The A260/A280 nm ratio should be between 1.8 and 2.0 to ensure a high level of DNA purity. DNA was preserved at -20°C and a volume containing 20 μ g of pure DNA of each sample was lyophilized. The first enzymatic hydrolysis occurred when the lyophilized DNA was dissolved in ultrapure water, followed by a quick ice bath and a water bath at 100°C, and the subsequently addition of 2 μ L of potassium acetate 250mM (pH 5.4), 2 μ L of zinc sulfate 10 mM and 10 μ L of P1 nuclease (1 U/mL). The tubes were incubated at 37°C overnight. A second hydrolysis was carried out after adding 4 μ L of Tris-HCl (pH 8.3)

and 4 μ L of alkaline phosphatase (0.31 U/mL). The tubes were shaken for 2 hours at 37°C. After the incubation, 25 μ L of chloroform were added to each sample to inactivate the enzymes used in hydrolysis. The tubes were centrifuged at 13000g for 10 minutes. The quantification of m⁵dC was performed by HPLC (HP1050 HPLC System) and an UV detector (HP1050 Series Variable Wavelength Detector). A modification of the two-buffer gradient was developed, using a 250mm column (Agilent Zorbax SB-Phenyl, 250 x 4.6 mm, 5 μ m). Buffer A was 6.5 mM (NH₄)H₂PO₄ pH 3.95 filtered through a Milipore G5-22 (0.22 μ m). Solvent B was methanol 4% (v/v) HPLC grade (J. T. Baker®). We used a two-buffer step gradient system, 0-16min 96-4 (NH₄)H₂PO₄/methanol followed by a linear gradient to 20% Solvent B during 32 min. The flow rate was 1mL/min and eluates were monitored at 254nm. The injection volume was 20 μ L of a dilution of 1/10 of the hydrolyzed DNA. Standard bases (dC, dT, dG, dA – Sigma-Aldrich / 100 μ g/mL each) and m⁵dC (10 μ g/mL) were used for quantification. The results in μ g/mL were used to calculate the % rate of m⁵dC as compared to (m⁵dC + dC) * 100.

2.7. Data analysis and statistics

The results were grouped for statistical analysis according to the season of the year, beginning in Spring 2010 and finishing in Winter 2011. For statistical analysis the average of each sample \pm standard deviation was considered for each site in each season. Tukey paired comparison test was performed to test differences between samples and their respective controls. A significance level of p values less than 0.01 was accepted to indicate statistical significance, using the R software (v2.5.1, R Core Group, 2013).

3. RESULTS

3.1. Lipid peroxidation: MDA quantification.

After 280 days of exposure, fish of the species *O. niloticus* exposed to water of the negative control, MDA produced average rate of 11.69 nM MDA/mg protein. Organisms exposed to positive control (2.5 mg/L of potassium dichromate) showed average rates of 109.78 nM MDA/mg protein (Table 1). All rates observed for the positive control showed significant differences when compared to the negative control (p < 0:01).

Organisms exposed to surface water from the Cubatão do Sul river showed an increase in the rates of MDA toward the mouth of the river (upstream to downstream). The rates were averaged 10.21 nM MDA/mg protein for Site 1, 41.71 nM MDA/mg protein for Site 2, 55.59 nM

MDA/mg protein for Site 3 and 78.98 nM MDA/mg of protein for Site 4 (Table 1).

MDA rates observed during the study period showed significant differences recorded for the negative control ($p < 0.01$), except that recorded for the Site 1 during Spring 2010, Summer 2011 and Fall 2011.

3.2. Evaluation of the methylation of DNA by measurement of m⁵dC rates

For the same exposure conditions, fish of the species *O. niloticus* exposed to the waters of the negative control, produced rates between 5.47-5.71% of m⁵dC. Varriale and Bernardi (2006), observed for several species of fish belonging to the order Perciformes average rates of 4.00% m⁵dC, ranging from 2.85-5.47% of m⁵dC. Potassium dichromate (2.5 mg/L) used as positive control rates produced between m⁵dC of 38.51-44.65%, an average increase of 700% compared with the negative control.

Quantification of m⁵dC on fish erythrocyte exposed to environmental complex mixture of Cubatão do Sul water indicated significative hypermethylation in all samples (Fig. 2). This increased was observed (as well as MDA) incrementally towards the river mouth throughou the study period. For the Site 1 m⁵dC rates ranged from 9.01±1.02% (Spring 2010) e 17.55±2.49% (Winter 2011) of m⁵dC. The Site 2 had rates between 14.18±0.49% (Spring 2010) and 27.32±2.73% (Winter 2011) of m⁵dC. The Site 3 had rates between 18.86±1.31% (Spring 2010) and 33.16±2.60% (Winter 2011) of m⁵dC. The Site 4 had rates between 24.05±5.15% (Spring 2010) and 40.01±1.40% (Winter 2011) of m⁵dC. Conditions verified at the end of the study period for the Site 4 are very close to that observed in the positive control (potassium dichromate 2.5 mg/L).

4. DISCUSSION

Complex environmental mixtures such as water rivers are composed of numerous substances that can affect aquatic organisms and cause ecological disequilibrium. Some of these compounds can have toxic effects on organisms and, even at low concentrations, can undergo processes additive, synergistic and/or antagonistic to potentiate the toxic effect of this complex mixture, and could negatively impact aquatic organisms (Schwarzenbach et al., 2006; Baderna et al., 2011). The different substances present in complex environmental mixtures such as river waters are capable of generating epigenetic effects as induction of oxidative effects, and damage to the DNA level (Baccarelli and Bollati, 2009).

The results of this research to *O. niloticus* exposed to waters of Cubatão do Sul river indicate that this complex environmental mixture leads to increased rates of MDA and increased rates of DNA methylation in erythrocytes of *O. niloticus*. The results show that the samples collected induce a significant increase in both parameters in the upstream to downstream direction. There are few studies reporting effects of DNA hypermethylation (quantified by m^5dC), and oxidative stress evidenced by lipid peroxidation (measured by MDA) in erythrocytes of fish exposed to complex environmental mixtures such as river water. Some studies report the rates for different types of waste and substances such as pesticides, and tissues and organs such as kidneys, liver and gills (Aniagu et al., 2008; Contractor et al., 2004; Jin et al., 2010; Shugart et al., 1990; Strömquist et al., 2010; Mirbahai et al., 2011; Velisek et al., 2011; Wang et al., 2009; Xing et al., 2012; Zhou et al., 2001).

The region of influence of Cubatão South is significantly affected by agricultural processes, which highlights the culture of horticultural products. These crops require high frequency of pesticide application (Latorraca et al., 2008). Castilhos and Oliveira (2001) state that in the region of the Hydrographic Basin of Cubatão do Sul River, 95% of farms spray their crops with pesticides about five times a week. Brazil is the world's largest consumer of pesticides (Carneiro et al., 2012), and the main pesticides used in the state of Santa Catarina are glyphosate (Roundup ®), lambda cyhalothrin (Karate ®), atrazine and simazine (Herbimix ®) and azoxystrobin (priori Xtra ®) (Salvagni et al., 2011). Pesticides are known as a major concern in the aquatic environment due to their toxicity, persistence and tendency to accumulate in aquatic organisms (Joseph and Raj, 2010). These compounds represent a great danger to the aquatic fauna, especially fish, which represent a considerable part of the food chain and are a major source of protein-rich food for the population (Sharma and Singh, 2007).

Sakuragui et al., (2013) claim that there is a direct relationship between the contaminants from agricultural practices and contamination of the aquatic environment, reflecting oxidative damage in aquatic organisms present in this ecosystem. Sadaukas-Henry et al., (2011) emphasize that the application of pesticides in agricultural areas, rich in metals and organochlorine components are the main sources of toxic elements able to accumulate in the water column and sediment of rivers. The increased rates of MDA to *O. niloticus* checked throughout the course of the Cubatão do Sul river may be related to the entry of pesticides and other toxic compounds in the river water through runoff.

Many classes of environmental pollutants and / or its metabolites may cause toxicity related to oxidative stress, causing oxidative damage in fish (Velisek et al., 2011). The pesticide exposure of animals is known to induce LPO in various tissues being responsible for adverse biological effects (Datta et al., 1992).

Kadry et al., (2012) report that *Clarias gariepinus* chronically exposed to the pesticide atrasine showed significant increases in liver LPO organism compared to the negative control. Jin et al., (2010) attributed the increase of LPO by the increase rates of oxidation of polyunsaturated fatty acids in the liver observed in *Danio rerio* exposed to 100 µg/L atrasine (Liu et al, 2008; Valavanidis et al, 2006).

Another pesticide commonly used on crops of horticultural products is glyphosate, known to cause damage to the energy metabolism, and processes involving free radical generation, in the activity of acetylcholinesterase (Gluszczak et al., 2006, 2007; Langiano and Martinez, 2008). Significant increases in the rates of MDA in muscle (Gluszczak et al., 2007) and liver (Modesto and Martinez, 2010) of aquatic animals are attributed to oxidative stress induced exposure of glyphosate.

Variations in the activity of antioxidant enzymes are indicative of pollution caused by oxidative stress (Ahmad et al., 2000, Li et al., 2003). Sharma and Singh (2004) argue that the blood acts as a reflector pathophysiological body and therefore is an appropriate tool when you want to evaluate the damage of oxidative stress in organisms. In the present study, increases in the rates of MDA in erythrocytes indicate that fish may be experiencing a disorder in lipid membranes through exposure of *O. niloticus* pesticides, metals and other environmental contaminants in this complex mixture that is the water of the river.

Fish chronic exposure to highly polluted environments such as that seen in the terminal portions of Cubatão do Sul River shown to be unable to establish adequate antioxidant defenses, probably due to damage to hepatocytes and the antioxidant defense system, leading to oxidative damage (Sakuragui et al., 2013).

The rising rates of MDA observed in this study denote the cumulative nature of these effects of chronic toxicity and proved to be an important tool in the evaluation of oxidative stress in *O. niloticus* after exposure to the waters of Cubatão do Sul River.

This study also showed that the rates of DNA methylation of *O. niloticus* is affected by chronic exposure of fish to Cubatão do Sul River water. In our study, DNA hypermethylation was observed incrementally over the course of the river water, and shown to have a cumulative effect

with peaks corresponding to that seen in positive control for the percentage of m⁵dC in the terminal portion of the river at the end of the study period (Winter 2011).

The contamination of the Cubatão do Sul River by human occupation of its banks, with the release of untreated domestic sewage, runoff from agricultural and other nonpoint sources of pollution, leads to the aquatic environment metals, pesticides, organochlorine compounds and other toxic substances that may be related to changes in the pattern of epigenetic *O. niloticus*.

In a recent review of epigenetic effects of pesticides (Collota et al., 2013), no studies were found referring to the percentage of biological DNA methylation in fish. Baccarelli and Bollati (2009) claim that many classes of environmental pollutants are capable of causing epigenetic damage. Among these pollutants can include metals, pesticides, organochlorine compounds, among others.

Li et al., (2009) observed hypermethylation of DNA in *Danio rerio* embryos exposed to arsenic (2 mM) after 48 hours of exposure. Different metals, such as arsenic are internationally recognized as potentially carcinogenic agents and may be present in soil and become part of the composition of pesticides, can be added for the rivers with runoff (Sabo-Attwood et al., 2006).

It is possible to relate the results observed in *O. niloticus* after exposure to complex environmental mixture of water from Cubatão do Sul river in the terminal portion (sample station 4 - Fig 1) with the results observed in the positive control (Fig. 2D). Organisms exposed to these samples (sampling station 4 - Winter 2011) showed similar percentages m⁵dC bodies exposed to 2.5mg/L of potassium dichromate. Chromium is one of the metals most surveyed regarding their mutagenic and carcinogenic properties (IARC, 1990). Kondo et al., (2006) demonstrated that exposure to chromium-containing compounds in the composition influence the processes that lead to hypermethylation. Labra et al., (2004) found that the DNA hypermethylation may be related to exposure to chromium producing variations in one or more cytosine residues, making the most frequent DNA hypermethylation of the DNA hypomethylation. Although metals such as chromium having its own mechanism of action, it is believed that ROS are involved in these processes that can lead to epigenetic alterations in DNA methylation without causing mutations of DNA bases (O'Brien et al., 2003).

Oxidative stress can cause damage to the DNA, causing changes in methylation, which may lead to carcinogenesis (Traore et al., 2000).

With the knowledge that the different compounds present in the water from the Cubatão do Sul river, such as metals, pesticides, organochlorine lead to LPO by oxidative stress, causing DNA mutations (Halliwell and Gutteridge, 2005) it is possible to relate the results of increased LPO and DNA hypermethylation induced in *O. niloticus* after chronic exposure to complex environmental mixture of river water from Cubatão do Sul. Knowing that Cubatão do Sul river is an important ecosystem and the main source of water supply for the metropolitan region of Florianópolis, and observing the results this study highlights the extreme importance of the data found by warn the possible occurrence of changes in epigenetic. These changes can increase along the food chain reaching humans, may initiate the degenerative processes, such as cancer.

5. CONCLUSION

The rates of MDA and m⁵dC demonstrated to be effective biomarkers for assessing the toxicity of complex environmental mixtures such as river water. The results of this study demonstrate that the complex environmental mixtures of water from Cubatão do Sul may interfere with epigenetic system of *O. niloticus* and serve as a warning to toxicological parameters, with emphasis on processes genotoxic, mutagenic and epigenetic be included in the monitoring of water quality.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil). We would like to thank Piscicultura Panamá, (Paulo Lopes – SC, Brazil), for providing the fish used in this study.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no direct financial relationships with Zanclus®, SarloBetter®, J. T. Baker®, Roundup®, Karate®, Herbimix®, Priori Xtra® and that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523, 37-48.
- Al-Sabti, K., 1995. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutat. Res.* 335, 109-120.

- Aluru, N., Karchner, S.I., Hahn, M.E., 2011. Role of DNA methylation of AHR1 and AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish; *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 101, 288-294.
- ANA (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS). 2005. Brasil. Panorama da Qualidade das Águas Superficiais no Brasil. Cadernos de Recursos Hídricos.
- Aniagu, S.O., Williams, T.D., Allen, Y., Katsiadaki, I., Chipman, J.K., 2008. Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17- β oestradiol. *Environ. Int.* 34, 310-317.
- Baccarelli, A., Bollati, V., 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr. Opin. Pediatr.* 21, 243-251.
- Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M., Benfenati, E., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res.* 111, 603-613.
- Bardakci, F., Skibinski, D.O.F., 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity.* 73, 117-123.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carneiro, F., Pignati, W., Rigotto, R. M., Augusto, L. G. S., Rizzolo, A., Muller, N. M., Alexandre, V. P., Friedrich, K., Mello, M. S. C. 2012. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar, Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.abrasco.org.br/UserFiles/Image/_Dossie%20abrasco%20por%20t.pdf. Acesso em março de 2013.
- CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Abastecimento). 2013. Expedição ao Rio Cubatão. Disponível em: <http://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/expedicao-ao-rio-cubatao#0> Acesso em dezembro de 2012.
- Castilhos JR, A. B., Oliveira, F. B. 2000. Diagnóstico de produtos residuários do uso de agrotóxicos utilizados na bacia hidrográfica do Cubatão do Sul - BHCS/SC. Agropecuária Catarinense, Santa Catarina. 13, 48-51.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-

genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81-91.

Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264-271.

Collota, M., Bertazi, P. A., Bollati, V. in press. Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>

Contractor R. G., Foran C. M., Li S., Willett K.L. 2004 Evidence of gender and tissue specific promoter methylation and the potential for ethinylestradiol induced changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor and aromatase genes. *J Toxicol Env Health*, 67, 1-22.

Datta, C., J. Gupta, A. Sarkar and D. Sengupta, 1992. Effect of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma. *Indian Journal of Experimental Biology*, 30: 65-67

Erickson, R. J., Nichols, J. W., Cook, P. M., Ankley, G. T. 2008. Bioavailability of chemical contaminants in aquatic system. In: Di Giulio, R. T., Hinton, E. D. (Eds). *The Toxicology*, Taylor & Francis. 523-561.

Esteller M, Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61. 3225-3229.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynomenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11, 81-128.

Flohr, L., Fuzinato, C. F., Melegari, S. P., Matias, W. G. 2012. Effects of exposure to soluble fraction of industrial solid waste on lipid peroxidation and DNA methylation in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, as assessed by quantification of MDA and m⁵dC rates. *Ecotox Env Saf.* 63-70.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M.B., Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237-241.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146, 519-524.

- Gontijo, A. M. M. C., Barreto, R. E., Speit, G., Reyes, V. V. A., Volpato, L. G., Salvadori, D. M. F. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat. Res.* 534, 165-172.
- Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish, *Genet. Mol. Biol.* 23, 235–239.
- Grisolia, C. K., Starling, F. L. R. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491, 39-41.
- Grisolia, C. K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., da Silva, I.C.R., Barbosa, A.C., Jose G. Dorea, J.G. 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.* 32, 138-143.
- Gronbaek K, Hother C, Jones P. A. 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 115, 1039-1059.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2005. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3 ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hermes-Lima, M. 2004 Oxygen in biology and biochemistry : role of free radicals. In : Storey, K. B. (Ed.), *Functional Metabolism : Regulation and Adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken. 319-368.
- International Agency for Research on Cancer - IARC. 1990. Chromium, nickel and welding. In: IARC, editor. *Monographs on the evaluation of carcinogenesis risk to humans*. Lyon: IARC, 49—255.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2010. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>. Acesso em abril, 2013.
- Jin, Y.X.; Zhang, X.X.; Shu, L.J.; Chen, L.F.; Sun, L.W.; Qian, H.F.; Liu, W.P. and Fu, Z.W. 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78, 846–852.
- Joseph, B., Raj, S.J. 2010. Effect of curacron toxicity on the total serum protein content of *Cyprinus carpio*. *Toxicol. Environ. Chem.*, 92: 1889-1893.
- Kadry, S. M., Marzouk, M. S., Amer, A. M., Hanna, M. I., Azmy, A. H. and Hamed, H. S. 2012. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. *Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish.*, 16, 83 – 98.
- Kaiser, J. Oliveira, M., Zotz, W. 2012. In: *Atlas de Santa Catarina*. 3ª ed. Editora Letras Brasileiras. Florianópolis/SC. 123p.

- Kondo, K., Takahashi, Y., Hirose, Y., Nagao, T., Tsuyuguchi M., Hashimoto, M., Ochiai, A., Moden, Y., Tangoku, A. 2006. The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer*. 53, 295-302.
- Kullis, M., Esteller, M. 2010. Epigenetics and Cancer, Part A. *Advances in Genetics*, 70, 27–56.
- Labra, M., Grassi, F., Imazio, S., Di Fabio, T., Citterio, S., Sgorbati, S., Agradi, E. 2004. Genetic and DAN-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus L.* *Chemosphere*. 54, 1049-1058.
- Lambolez, V. C., Vasseur, P., Ferard, J. F., Gisbert, T. 1993. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Saf.* 28, 317–328.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 222–231.
- Latorraca A., Marques G., Sousa K., Fornés N. 2008. Pesticides used in tomato production in Goiânia and Goianópolis and their effects on human health. *Ciências Saúde*. 19, 365-374.
- Li, J., Lin, J. C., Wang, H., Peterson, J. W., Furie, B. C., Furie, B., Booth, S. L., Volpe, J. J., Rosenberg, P. A. 2003. Novel Role of Vitamin K in Preventing Oxidative Injury to developing Oligodendrocytes and Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 23, 5816-5826.
- Li, D., Lu, C. , Wang, L. , Hu, W., Cao, Z., Sun, D., Xia, H., Ma, X., 2009. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 91, 229-237.
- Liu, Y.; Wang, J.S.; Wei, Y.H.; Zhang, H.X.; Xu, M.Q. and Dai, J.Y. (2008): Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver *Aquat. Toxicol.*, 89 : 242–250.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 13-30.
- Martins, R. P., Melo Filho, E., Franco, D. *Circulação hidrodinâmica e dispersão de poluentes na Baía de Florianópolis. Relatório*, 1997.
- Matias, W.G., Creppy, E.E, 1998a. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Ocadáico, uma toxina marinha. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 4, 40-44.

- Matias, W.G., Creppy, E.E., 1998b. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. *Environ. Toxic. Water.* 4, 83-88.
- Millar, D. S., Holliday, R., Grigg, G. W. 2003. Five not four: history and significance of the fifth base. In: *The Epigenome, Molecular Hide and Seek*. Beck, S., Olek, A. (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim, 3–20.
- Mirbahai L, Williams T. D., Zhan H., Gong Z., Chipman J.K. 2011. Comprehensive profiling of zebrafish hepatic proximal promoter CpG island methylation and its modification during chemical carcinogenesis. *BMC Genomics*, 12, 1-16.
- Mishra, A., Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 136-141.
- Modesto K. A., Martinez C. B. R. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 78, 294–299.
- O'Brien T. J., Ceryak S., Patierno S. R. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res.* 533, 3—36.
- Reifferscheid, G., Grummt, T. 2000. Genotoxicity in German surface waters – results of a collaborative study. *Water, Air and Soil Pollution*, 123, 67-79.
- Sabo-Attwood, T., Ramos-Nino, M., Mossman, B.T., 2005. Environmental carcinogenesis. In: Chang, A., Ganz, P. (Eds.), *Oncology: an evidence-based approach*. Springer Verlag Publishers, 233-243.
- Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., 2011. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. *Environmental Monitoring and Assessment* 181, 29 - 42.
- Salvagni, J., Ternus, R. Z., Fuentefria, A. M. 2011. Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil *Gen. Mol. Biol.* 34, 122-126.
- Sakuragui, M. M., Paulino, M. G., Pereira, C. D. S., Carvalho, C. S., Sadauskas-Henrique, H., Fernandes, M. N. 2013. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environmental Pollution*, 178, 41-51.

- Sharma, G. and Singh, S. 2004. Studies on the effect of intoxicant indofil on the blood morphology of *Channa punctatus* (Bloch.) Bionotes, 6, 20-20.
- Sharma, G. and Singh, 2006. Assay of some blood parameters of the fish, *Channa punctatus* (Bloch.) after intoxication of Indofil. Bionotes, 8, 21-21.
- Sharma, G. and Singh, S. 2007. Effect of indofil toxicity on MCHC of *Channa punctatus* (Bloch.). J. Environ. Res. Dev. 261-263.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. Science, 313, 1072-1077.
- Shugart, L.R., 1990. 5-Methyl deoxycytosine content of DNA from bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) exposed to benzo[a]pyrene. Environ. Toxicol. Chem. 205-208.
- Souza, T. S., Fontanetti, C. S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. Mutat. Res. 87-93.
- Stromqvist M, Tooke N, Brunstrom B. 2010. DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*) sex and tissue differences and effects of 17 α -ethinylestradiol exposure. Aquat Toxicol. 98, 275-281.
- Traore, A., Ruiz, S., Baudrimont, I., Sanni, A., Dano, S. D., Guarigues, P. H., Narbonne, J.F., Creppy, E.E., 2000. Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m⁵dC and 8-(OH)-dG) in Caco-2 cells. Mol. Toxicol. 74, 79-84.
- Traverso, T., Menini, S., Maineri, E.P., Patriarca, S., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., 2004. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. J. Gerontol. A- Bio. 890-895.
- USGS (US Geological Survey Science for a Pesticides in Stream Sediment and Aquatic Biota). 2010. <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/fs09200/fs09200.pdf>. Acesso em abril, 2013.
- Uz-Zaman, M., Sarker, S.R., Hossain, S., 2008. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish (*Puntius sophore*) tissue in comparison with those of freshwater fish. J. Food Lipids. 15, 198-208.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. Bernardi, G. 2006 Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic

- organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.64, p.178- 189, 2006.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 13, 57-149.
- Varriale, A., Bernardi, G. 2006. DNA methylation and body temperature in fishes. *Gene*, 111-121.
- Velisek, J.; Stara, A.; Kolarova, J. and Svobodova, Z. (2011): Biochemical, physiological and morphological responses in common carp, *Cyprinus carpio L.* after long term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pest. Biochem. Physiol.*, 100: 305-313.
- White, P. A., Rasmussen, J. B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutat. Res.* 410, 223-236.
- White, P. A. 2004. The sources and potential hazards of mutagens in complex environmental matrices. *Mutat. Res.* 567, 107-108.
- Wilhelm Filho, D. 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Front. Biosci.* 12, 1229-1237.
- Xing, H.; Li, S.; Wang, Z.; Gao, X.; Xu, S. and Wang, X. (2012): Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pest. Biochem. Physiol.*, In Press.
- Wang, Y., Wang, C., Jiliang Zhang, J., Yixin Chen, Y., Zhenghong Zuo, Z., 2009. DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. *Aquat. Toxicol.* 95, 93-98.
- Zhou XW, Zhu GN, Jilisa M, Sun JH. Influence of Cu, Zn, Pb, Cd and their heavy metal ion mixture on the DNA methylation level of the fish (*Carassius auratus*). *China Environ Sci* 2001; 21:549-52.

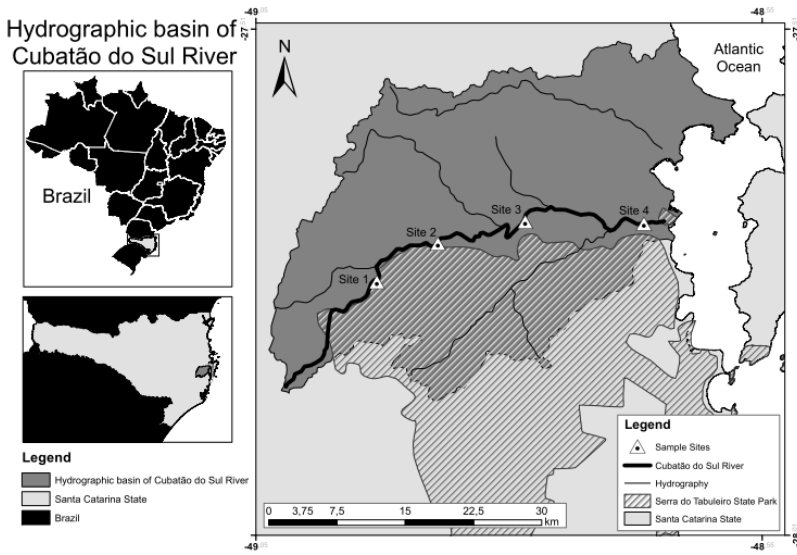


Figure 1. Hydrographic basin of the Cubatão do Sul River in southern Brazil and spatial distribution of sampling sites of water samples.

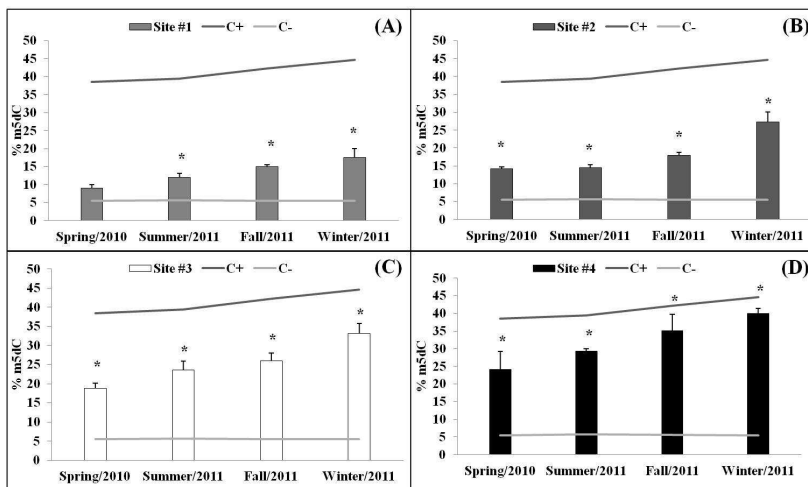


Figure 2. (A) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to complex environmental mixture of river water from site #1, negative and positive control with potassium dichromate (2.5 mg/L). (B) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to complex environmental mixture of river water from site #2, negative control and positive control with potassium dichromate (2.5 mg/L). (C) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to complex environmental mixture of river water from site #3, negative control and positive control with potassium dichromate (2.5mg/L). (D) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to complex environmental mixture of river water from site #4, negative control and positive control with potassium dichromate (2.5mg/L). The values represent the average of each replicate \pm standard deviation (n = 2). (*p < 0.01)

Table 1: MDA rates in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to complex environmental mixture of water from Cubatão do Sul River along sample stations (site #1, #2, #3 and #4), negative control and positive control (potassium dichromate 2.5mg/L). The results are expressed as means \pm SD in nM MDA/mg protein. * $p < 0.01$.

Samples	MDA rate (nM MDA/mg of protein)
Negative control	
Spring 2010	11.05 \pm 0.47
Summer 2011	12.26 \pm 0.44
Fall 2011	12.03 \pm 0.86
Winter 2011	11.44 \pm 1.19
Site 1	
Spring 2010	17.70 \pm 1.30
Summer 2011	20.18 \pm 0.87
Fall 2011	22.78 \pm 2.47
Winter 2011	23.77 \pm 2.00 *
Site 2	
Spring 2010	37.72 \pm 2.72 *
Summer 2011	34.38 \pm 4.81 *
Fall 2011	46.77 \pm 2.86 *
Winter 2011	47.98 \pm 0.75 *
Site 3	
Spring 2010	50.97 \pm 3.55 *
Summer 2011	46.35 \pm 3.35 *
Fall 2011	61.17 \pm 3.23 *
Winter 2011	63.87 \pm 1.06 *
Site 4	
Spring 2010	66.60 \pm 1.59 *
Summer 2011	65.03 \pm 1.16 *
Fall 2011	87.45 \pm 4.87 *
Winter 2011	96.86 \pm 2.42 *
Positive Control	
Spring 2010	107.68 \pm 1.42 *
Summer 2011	109.98 \pm 0.46 *
Fall 2011	111.06 \pm 1.23 *
Winter 2011	110.41 \pm 0.69 *

CAPÍTULO IX

9 ANEXOS

ANEXO 1 – Dados de qualidade de água (metais pesados, compostos orgânicos e pesticidas)

	Parâmetro	[]	L.D. ²	Método
Metais Pesados ¹	Alumínio	1.28 mg Al.L ⁻¹	0,01	3030F e 3120B ³
	Bário	0.0215 mg Ba.L ⁻¹	0,0002	3030F e 3120B ³
	Cobre	0,0017 mg Cu.L ⁻¹	0,0005	3030F e 3120B ³
	Ferro	2,66 mg Fe.L ⁻¹	0,006	3030F e 3120B ³
	Manganês	0,1680 mg Mn.L ⁻¹	0,0002	3030F e 3120B ³
	Zinco	0,065 mg Zn.L ⁻¹	0,002	3030F e 3120B ³
Compostos Orgânicos e Pesticidas ¹	Acrilamida	<0,1 µg/L	0,1	EPA 8032-A ⁴
	Glifosato	<50 µg.L ⁻¹	50	EPA 547 ⁵
	2,4-D	<10 µg.L ⁻¹	10	EPA 8270-D ⁶
	Alaclor	<1,0 µg.L ⁻¹	1	EPA 8270-D ⁶
	Aldrin e Dieldrin	<0,01 µg.L ⁻¹	0,01	EPA 8270-D ⁶
	Atrasina	<0,2 µg.L ⁻¹	0,2	EPA 8270-D ⁶
	Bentazona	<1,0 µg.L ⁻¹	1	EPA 8270-D ⁶
	Benzo-a-pireno	<0,01 µg.L ⁻¹	0,01	EPA 8270-D ⁶
	DDT	<0,5 µg.L ⁻¹	0,5	EPA 8270-D ⁶
	Endrin	<0,5 µg.L ⁻¹	0,5	EPA 8270-D ⁶
	Heptaclor	<0,03 µg.L ⁻¹	0,03	EPA 8270-D ⁶
	Metolaclor	<1,0 µg.L ⁻¹	1	EPA 8270-D ⁶
	Pentaclorofenol	<5,0 µg.L ⁻¹	5	EPA 8270-D ⁶

¹ Dados referentes a média de cada parâmetro proveniente das amostras de água coletadas no Rio Cubatão do Sul em local monitorado pela CASAN situado nas proximidades da captação da água bruta, a jusante do Ponto 3. Fonte: CASAN.

² Limite de detecção.

³ APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION) 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. Washington.

⁴ EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 1996. Método 8032-A. Acrylamide by Gas Chromatography.

⁵ EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 1990. Método 547. Determination of Glyphosate in drinking water by direct-aqueous injection HPLC, post-column derivatization and fluorescence detection.

⁶ EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) 2007. Método 8270-D. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

ANEXO 2 – Dados de qualidade de água (parâmetros físico-químicos e biológicos)

Parâmetros ¹	Primavera 2010	Verão 2010	Outono 2010	Inverno 2010
ph	6,81	6,70	6,92	6,68
OD (mg/L)	8,31	6,86	8,42	8,58
Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	13,58	13,25	13,79	15,33
Dureza (mg/L as CaCO ₃)	23,58	12,17	20,34	23,10
Cor (mg/L PtCo)	47,50	110,00	42,36	67,25
Turbidez (NTU)	9,29	29,23	7,51	19,92
Sólidos Totais (mg/L)	-	671,00	269,50	228,50
Nitrito ² (mg/L)	-	0,01	0,01	0,00
Nitrato ² (mg/L)	-	1,54	0,00	0,00
Amônia ² (mg/L)	-	0,72	0,28	0,04
Fósforo Total ² (mg/L)	-	0,45	0,11	0,00
Cloreto ² (mg/L)	21,12	11,57	21,25	22,75
Ferro ² (mg/L)	0,62	1,74	0,56	0,50
Alumínio ² (mg/L)	0,14	0,05		0,02
Sulfato ² (mg/L)	-	1,00	1,25	9,00
Sulfeto ² (mg/L)	-	0,04	0,04	0,04
Coliformes totais ² (NMP/100mL)	1.732,87	16.428,00	16.973,83	7.668,67
Coliformes fecais ² (NMP/100mL)	382,33	3.022,79	2.061,61	1.235,37

¹ Dados referentes a média de cada parâmetro proveniente das amostras de água coletadas no Rio Cubatão do Sul em local monitorado pela CASAN situado nas proximidades da captação da água bruta, a jusante do Ponto 3. Fonte: CASAN.

² APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION) 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21. ed. Washington.