



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**PERFIL DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE  
DANOS NO DNA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES DO  
LAGO PARANOÁ, BRASÍLIA-DF, BRASIL.**

**CARLA LETÍCIA GEDIEL RIVERO**

Dissertação apresentada ao curso de  
pós-graduação em Patologia  
Molecular da UnB como requisito  
parcial para obtenção do título de  
mestre.

Fevereiro-2007.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**PERFIL DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E DE  
DANOS NO DNA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PEIXES DO  
LAGO PARANOÁ, BRASÍLIA-DF, BRASIL.**

**CARLA LETÍCIA GEDIEL RIVERO**

**Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Cesar Koppe Grisolia**

Dissertação apresentada ao curso de  
pós-graduação em Patologia  
Molecular da UnB como requisito  
parcial para obtenção do título de  
mestre.

Fevereiro-2007.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rivero, Carla Letícia Gediel

Perfil da Frequência de Micronúcleos e de Danos no DNA de Diferentes Espécies de Peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil.

Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina / Universidade de Brasília, 2007.

Orientador: César Koppe Grisolia

1. genotoxicidade; 2. desreguladores endócrinos; 3. micronúcleo; 4. cometa; 5. lago Paranoá; 6. nonilfenol



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Dissertação de Mestrado

CARLA LETÍCIA GEDIEL RIVERO

Título:

**Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no dna de diferentes espécies de peixes  
do lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil.**

Comissão examinadora:

---

*Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia*  
*Presidente/Orientador*  
*UnB*

---

*Prof. Dr. Eduardo Cyrino de Oliveira Filho*  
*Membro Titular*  
*Embrapa / CPAC*

---

*Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos*  
*Membro Titular*  
*UnB*

Brasília, 02 de fevereiro de 2007.

**Dedico este trabalho a  
minha querida família e a  
todos que me apoiaram,  
mesmo na distância e  
torceram imensamente pelo  
meu sucesso.**

**“Não são nossas habilidades que mostram o que realmente somos. São nossas escolhas”.J.K. Rowling.**

**“Não possuímos certezas, apenas oportunidades”.**

**V.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Brasília, ao Programa de Pós - Graduação em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, UnB e principalmente a CAPES por proporcionar condições para o desenvolvimento do trabalho e pelo incentivo à pesquisa.

Ao CNPq/PRONEX, pelo apoio no desenvolvimento do Projeto sobre o Impacto de Substâncias Tóxicas no Bioma Lago Paranoá, projeto nº31, processo nº 193.000.121/2004.

A colaboração da CAESB, sempre apoiando a pesquisa e possibilitando as coletas para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer à minha família, que com muito esforço e amor me ajudaram a chegar até aqui. Minha mãe com seu apoio amoroso e conselhos sábios, meu pai com sua torcida discreta e ao meu irmão com seu sentimento à distância.

Agradeço especialmente ao meu querido chefe, orientador e amigo, professor Cesar Koppe Grisolia. Agradeço toda a paciência que teve para me transmitir seus ensinamentos, os momentos de conselhos para um melhor rendimento e principalmente a amizade.

À professora Maria Fernanda por seus ensinamentos essenciais para o desenvolvimento de grande parte da minha dissertação. Um grande obrigado por tudo!

À minha querida amiga Eliza, que é uma garota maravilhosa, cheia de conhecimentos e de boa vontade em ajudar a todos do laboratório. Mantém nossas vidas organizadas e o trabalho sempre flui melhor quando ela está por perto.

Ao meu namorado José Rodolfo, que apesar de nos encontrarmos no meio da caminhada, me ajudou e deu muito apoio para que o meu estresse não chegasse ao limite, me confortando e ajudando no que pode com amor e carinho.

Agradeço a todas as gurias do laboratório, amigas de conversas e desabafos. O mestrado não é fácil né?!?! Bom, aí vai... Adriana, Flávia, Ana Elizabeth, Ana Luiza, Lane, Júlia, Daniela, Luciana, Camila, Leonora, Neda e Miriam. Ao Arthur, um obrigado especial pelos momentos hi-tech de muita alegria. Muito obrigada a todos pela contribuição direta ou indireta que tiveram no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Djalma você foi ótimo, me ensinando a parte histológica sempre com muita disposição e contentamento. Muito Obrigada! Ornil, você foi muito legal, sempre disposto a nos emprestar o computador para podermos resolver assuntos pessoais e profissionais.

Karina, Adriano e Gabriella, muito obrigada pelos momentos felizes que passamos juntos durante a realização das nossas coletas, vocês foram essenciais para a realização deste trabalho. Ricardo, um novato que veio com força total e que mesmo no final de tudo colaborou com a finalização do trabalho.

À professora Izabel, por ter nos ajudado na análise estatística. Professora, você foi essencial para que o trabalho ficasse lindo, sem sua ajuda seria bem mais difícil.

Agradeço a todos os amigos (Emanuel, Érico, Fabrício, Braz, Ivone, Rudinei, Diana, Karla, Paula, Carla, Renato, Nina, Xande, Lis (e Livinha), Leo, Caru, Sônia, Dilnei, etc...) que estando perto ou longe me mantiveram firme e com a certeza que sempre estão comigo, mandando energia e pensamentos positivos a todo instante. Fazendo da minha vida a mais completa possível no quesito amizade.

Se por algum acaso não citei todos que deveriam estar aqui, me desculpem, mas a cabeça às vezes falha e desta maneira sintam-se todos agraciados.

## ÍNDICE

Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

*Abstract*

1. Introdução Geral .....	02
2. Objetivos.....	04
3. Revisão da Literatura.....	05
3.1. Ecogenotoxicologia aquática .....	06
3.2. Peixes como sistema teste animal.....	08
3.3. Lago Paranoá .....	10
3.4. Avaliação da genotoxicidade e da toxicidade de substâncias químicas: Teste de Micronúcleo e Anomalias Nucleares.....	12
3.5. Teste do Cometa .....	16
3.6. Desreguladores Endócrinos .....	18
3.7. Nonilfenol etoxilado .....	20
4. Materiais e Métodos .....	22
4.1. Teste de micronúcleo e anomalias nucleares.....	25
4.2. Teste do Cometa .....	27
4.3. Avaliação genotóxica e de alterações gonadais causadas pelo nonilfenol etoxilado em <i>O. niloticus</i> .....	29

4.4. Teste para determinação de efeitos adversos em tecido gonadal. Avaliação dos efluentes finais das estações de tratamento de esgoto .....	35
5. Resultados.....	37
5.1. Avaliação genotóxica de espécies de peixe do Lago Paranoá.....	38
5.1.1. Teste do micronúcleo e anomalias nucleares.....	38
5.1.2. Teste do Cometa .....	42
5.2. Genotoxicidade e alterações gonadais em peixes causadas pelo nonilfenol .....	43
5.2.1. CL 50 do nonilfenol na espécie <i>O. niloticus</i> .....	43
5.2.2. Teste do Micronúcleo e Anomalias nucleares .....	44
5.2.3. Teste do Cometa .....	46
5.2.4. Alterações gonadais causadas pelo nonilfenol .....	48
5.3. Avaliação dos efeitos adversos causados pelo efluente final das estações de tratamento de esgoto em gônadas de peixes.....	50
6. Discussão.....	54
6.1. Avaliação físico – química das águas do lago.....	55
6.2. O peixe como sistema teste.....	55
6.3. Genotoxicidade do Lago Paranoá.....	56
6.3.1. Teste do micronúcleo.....	57
6.3.2. Teste do Cometa .....	57
6.3.3 Anormalidades nucleares.....	58
6.4. Ação do Nonilfenol etoxilado na espécie <i>O. niloticus</i> .....	58
6.5. Efeitos do nonilfenol em tecido gonadal de <i>O. niloticus</i> .....	60

6.6. Efeitos gonadais causados pelo efluente final das estações de tratamento de esgoto das Asas Norte e Sul em peixes da espécie <i>O. niloticus</i> .....	61
7. Conclusões.....	62
8. Referências Bibliográficas.....	64
9. Anexos .....	76

## **ABREVIATURAS**

EPA ou USEPA – Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

Semarh – Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos

TBT – Tributiltin

TBTO – Tributiltinoxido

$\beta$  – HCH –  $\beta$  – Hexaclorociclohexano

MN – Micronúcleo

ID – Índice de danos no DNA

APEO – Alquilfenol polietoxilado

NPEO – nonilfenol polietoxilado

NP - Nonilfenol

DE – Desreguladores Endócrinos

CAESB – Companhia de Tratamento de Esgoto de Brasília

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

LMP – Agarose com baixo ponto de fusão

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

ASSTJ – Associação dos Servidores do Tribunal de Justiça

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

QL – Quadra do Lago

LH – Hormônio Luteinizante

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DQO – Demanda química de oxigênio

TKN - Nitrogênio Total Kjeldahl

PT – Fósforo total

SS – Sólidos em suspensão

OI a OV – Ovócitos do tipo I até ovócitos do tipo V

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Médias e desvios padrões das anormalidades nucleares registradas em 1000 células de eritrócitos do sangue periférico das espécies de peixes estudadas do Lago Paranoá (Mann Whitney –  $U$ ,  $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Representação do número total de indivíduos analisados, das médias e desvios padrões dos índices de danos calculados nos eritrócitos das cinco espécies estudadas do Lago Paranoá.

**Tabela 3.** Número total de indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* utilizados nos tratamentos com nonilfenol, médias e desvios padrões de micronúcleos encontrados nos peixes estudados.

**Tabela 4.** Representação do número de indivíduos, média e desvios padrões das anormalidades nucleares encontradas nos tratamentos com nonilfenol.

**Tabela 5.** Representação do número de indivíduos, média e desvio padrão dos índices de danos dos tratamentos com o nonilfenol.

**Tabela 6.** Desempenho Operacional da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Norte. Período: Julho de 2005 à julho de 2006.

**Tabela 7.** Desempenho Operacional da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Sul. Período: Julho de 2005 à julho de 2006.

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

**Figura 1.** Figura do Lago Paranoá, onde se pode visualizar os quatro pontos de coletas localizados nos braços do lago e na zona central do lago (setas). FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 2.** Micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico de *Tilapia rendalli*, corados com Giemsa 5%.

**Figura 3.** Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico. FONTE: Fenech, 2000.

**Figura 4.** Indução de intersexo em machos de medaka (*Oryzias latipes*) após exposição ao  $\beta$ -HCH. A figura mostra a presença de ovócitos e túbulos espermáticos na mesma gônada. (a) ovócitos tipo II, demonstrando presença de gônada feminina; (b) cistos de espermátides, mostrando a presença da gônada masculina. FONTE: Wester *et al.*, 2004.

**Figura 5.** Espécie *Geophagus brasiliensis* conhecida popularmente por Acará amarelo. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 6.** Espécie *Astyanax binaculatus lacustres*, mais conhecido como Lambari. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 7.** Espécie *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecida como Traíra. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 8.** Espécie *Steindacnerina inculpita*, popularmente conhecida como Sagüiru. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 9.** Espécie *Cyprinus carpio*, também conhecida como Carpa. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 10.** Espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como Tilápia. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 11.** Espécie *Cichla temensis*, também conhecida como Tucunaré. FONTE: Semarh, 2005.

**Figura 12.** Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.

**Figura 13.** Foto de microscopia de gônadas de fêmeas da espécie *O. niloticus*, onde podemos visualizar um indivíduo em maturação inicial, classificado como em período não reprodutivo, aumento de 400x (a); indivíduo maduro, classificado como indivíduo em período reprodutivo, aumento de 40x (b).

**Figura 14.** Foto de microscopia de gônadas de machos da espécie *O. niloticus*, onde podemos visualizar um indivíduo em recuperação, classificado como em período não reprodutivo (a); indivíduo semi-esgotado, classificado como indivíduo em período reprodutivo (b). Aumento de 400x.

**Figura 15.** Tanque de escoamento do efluente final das estações de tratamento de esgoto, onde foi realizada a coleta.

**Figura 16.** Gráfico da distribuição das médias e desvios padrões dos micronúcleos encontrados nas espécies de peixes estudadas do Lago Paranoá, DF, 2006.

**Figura 17.** Foto de microscopia de eritrócitos de peixe mostrando uma célula binucleada (seta a) e uma célula com núcleo “blebbed” (seta b).

**Figura 18.** Foto de microscopia de eritrócito de peixe mostrando uma célula com núcleo com anomalia do tipo “lobed” (seta a). Na seta b, podemos visualizar um micronúcleo.

**Figura 19.** Foto de microscopia onde podemos observar eritrócitos de peixe com alterações nucleares do tipo “notched” (setas a) e uma célula com micronúcleo (seta b).

**Figura 20.** Gráfico da distribuição das anomalias nucleares nas espécies estudadas do Lago Paranoá, DF, 2006.

**Figura 21.** Gráfico representando a média, desvio padrão e mediana (em vermelho) dos IDs das espécies do Lago Paranoá. OBS: o asterisco são dados “outlier”.

**Figura 22.** Curva de sobrevivência de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* tratadas com nonilfenol. CL 50 = 0.032 mL/L (Spearman-Karber).

**Figura 23.** Gráfico representando a distribuição das médias e desvios padrões das anomalias nucleares segundo os diferentes tratamentos com nonilfenol.

**Figura 24.** Gráfico da distribuição das médias, desvios padrões e mediana (em vermelho) dos índices de danos segundo as concentrações de nonilfenol.

**Figura 25.** Fotos de microscopia, em aumento de 40x, de ovócitos no estágio cinco de maturação, onde podemos observar o aumento da vitelogênese nos indivíduos expostos a concentração de 16 µL/L de nonilfenol etoxilado (b) em relação ao controle (a) 

**Figura 26.** Gráfico representando a frequência dos estádios de maturação das gônadas analisadas da espécie *O. niloticus* em duas concentrações diferentes de NP (1 e 10 µL/L).

**Figura 27.** Gráfico representando a frequência dos estádios de maturação das gônadas analisadas da espécie *O. niloticus* na concentração de 16 µL/L de NP.

**Figura 28.** Gráfico representando a classificação dos estádios de maturação, em reprodutivos e não reprodutivos, de peixes da espécie *O. niloticus* expostos ao efluente final da ETE norte

**Figura 29.** Gráfico representando a classificação dos estádios de maturação, em reprodutivos e não reprodutivos, de peixes da espécie *O. niloticus* expostos ao efluente final da ETE sul.

## RESUMO

O comprometimento da qualidade da água, devido às atividades humanas, chama a atenção para os desequilíbrios ecológicos. Dentre os diversos fatores que contribuem para a poluição do ambiente aquático estão à emissão de efluentes industriais, domésticos ou de origem desconhecida. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as águas do Lago Paranoá no Distrito Federal, de modo a verificar a genotoxicidade do ambiente por meio de peixes nativos e exóticos que habitam o lago. Foram realizadas cinco coletas em pontos distintos do lago, sendo quatro pontos nos braços (do Torto, Bananal, Riacho Fundo e do Gama) e um na zona central (Ermida Dom Bosco). Após a coleta das espécies *Geophagus brasiliensis* (acará amarelo), *Cichla temensis* (tucunarê), *Hoplias malabaricus* (traíra), *Astyamx binaculatus lacustres* (lambari), *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo), *Cyprinus carpio* (carpa), *Steindacnerina insculpita* (sagüiru), foram aplicadas metodologias do teste de micronúcleo, anomalias nucleares e o ensaio do cometa. A partir destes resultados pode-se verificar que a espécie *Cichla temensis* foi a que apresentou maior frequência de micronúcleos e a espécie *Steindacnerina insculpita* o maior índice de danos, dados encontrados por meio dos testes de MN e cometa, respectivamente. Além dos testes genotóxicos, foi realizada uma análise morfológica das gônadas de *O. niloticus*. Como controle positivo, utilizou-se o nonilfenol, conhecido poluente industrial, com efeito, sabidamente estrogênico. Os ensaios de genotoxicidade (micronúcleos e cometa) aplicados com nonilfenol apresentaram resultados negativos. Na concentração de 16 µL/L, observamos alterações gonadais como o aumento do tamanho dos ovócitos, bem como precocidade no processo de maturidade sexual em ambos os sexos. A análise morfométrica das gônadas femininas mostrou um aumento de duas vezes dos ovócitos tipo V nos animais tratados em relação aos ovócitos do controle. Estes resultados

foram utilizados como parâmetros para a avaliação dos efeitos do efluente final das estações de tratamento de esgoto da Asa Norte e Sul. Os efluentes finais das estações de tratamento de esgoto não apresentaram diferenças significativas na classificação dos estádios de maturação em relação ao controle, sobre as gônadas de *O. niloticus* expostas por 72 horas e submetidas aos mesmos ensaios do nonilfenol.

## ABSTRACT

The commitment of water quality due to human activities have been causing ecological disturbances in water ecosystems. Among different sources that contribute to water pollution, industrial and domestic effluents are well-known to have genotoxic properties. Therefore, this study was carried out with the propose of evaluating the waters of Lake Paranoá for genotoxic risk, using different specie of fishes. Fishes were sampled in five sites (Torto, Bananal, Riacho Fundo, Gama e Ermida Dom Bosco). The fish species *Geophagus brasiliensis*, *Cichla temensis*, *Hoplias malabaricus*, *Astyamx bimaculatus lacustres*, *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio* and *Steindacnerina insculpita* were studied through micronucleus test, comet assay and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes. Our results showed that *Cichla temensis* presented the highest frequency of micronucleus and *Steindacnerina insculpita* the highest DNA damage index, comparing to among the other studies species. The final effluent of the two wastewater treatment plant of Brasília City that address to the Lake Paranoá were also investigated on their possible endocrine activity on the gonads of fish. This study was carried out in *O. niloticus* exposed to final treated effluents for 72 hours. Nonylphenol ethoxylated (NP) is known by its estrogenic effects, was used as positive control. NP was tested also for genotoxicity in *O. niloticus* and both comet assay and micronucleus test and showed negative results. At concentration of 16 µL/L, NP showed significant activity causing premature growing of the ovocytes and premature sexual maturity both in males and females. The morphometric analisis of females gonads were based in the ovocytes in stage five. Comparing the ovocytes size between control and treated fish, the results clearly demonstrated hormonal-like effect of NP. The exposure of *O. niloticus* to final effluent of the wastewaters treatment plants did not show an increased number of stage five ovocytes.

# **1. INTRODUÇÃO GERAL**

O Lago Paranoá foi criado em 1959, juntamente com a construção da cidade de Brasília. Este reservatório tropical que não foi construído com a intenção de abastecer a cidade, desde o princípio sofre com as ações antropogênicas e o desenvolvimento urbano. Na década de 60, o Lago apresentava um grande acúmulo de matéria orgânica nas áreas onde eram despejados os efluentes domésticos não-tratados e com o intuito de solucionar este problema foram lançadas toneladas de algicidas, como sulfato de cobre (Semarh, 2005).

Na década de 90, foram construídas duas estações de tratamento de esgoto com o objetivo de tratar os efluentes domésticos provenientes de toda cidade, localizando-se, uma no final da Asa Sul e a outra no fim da Asa Norte. Sendo a principal fonte de poluição do lago é o esgoto doméstico, pois a cidade de Brasília não possui indústrias químicas e nem agrícolas.

Desde então, iniciaram-se uma série de pesquisas para monitorar o ecossistema do lago, tentando manter as condições bióticas e abióticas em equilíbrio. A Companhia de Tratamento de Água e Esgoto do Distrito Federal (CAESB) realiza o monitoramento mensal para avaliar a qualidade das águas do lago, utilizando os indicadores: demanda química de oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio dissolvido, fósforo dissolvido, turbidez e clorofila. Entretanto, a CAESB não avalia outros parâmetros como a presença de outros tipos de agentes poluidores, moléculas orgânicas e metais pesados, que podem ter algum efeito tóxico sobre a fauna do lago, bem como sobre a população que consome os seus peixes. Assim, torna-se importante a realização de diversos trabalhos voltados para a ecotoxicologia, objetivando a complementação do estudo realizado mensalmente pela CAESB, assim como um estudo que avalia as condições dos peixes quanto à presença de substâncias que podem alterar o seu material genético. As Estações de Tratamento de Esgoto despejam continuamente seus efluentes, após o tratamento, diretamente no Lago Paranoá, e torna-se interessante também pesquisar a presença de substâncias biologicamente ativas nessas águas.

## **2. OBJETIVOS**

- Determinar o índice de danos no material de espécies peixes do lago Paranoá.
- Avaliar o potencial genotóxico e estrogênico do nonilfenol etoxilado na espécie *O. niloticus*.
- Avaliar a influência do efluente final das estações de tratamento de esgoto nas gônadas desta espécie.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1. Ecogenotoxicologia aquática:**

A água é um recurso renovável, mas sua disponibilidade é variável e limitada. Ultimamente vários países sofrem com a escassez de água em determinados períodos do ano e mais de oitenta países sofrem sérios problemas de escassez de água (Pimentel *et al.*, 1997).

Fatores como pluviosidade, temperatura, evaporação e lixiviação determinam a disponibilidade da água. O crescimento da população não apenas reduz a disponibilidade da água, mas estressa todo o sistema ambiental. Além disso, fatores como a poluição, erosão e salinização associadas com a irrigação contribuem para o declínio das fontes de água e a ineficiência do seu uso (Pimentel *et al.*, 1994 citado em Pimentel, 1997). A escassez da água pode causar uma redução severa da biodiversidade tanto no ambiente aquático quanto no ecossistema terrestre (Postel *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, o aumento de contaminantes antropogênicos e outros estressores tal como a destruição de habitats tem provocado mudanças bruscas nos ecossistemas aquáticos. Correspondendo com os efeitos provocados, aumentou-se o interesse em questões como: a) acumulação e os efeitos tóxicos de contaminantes na sobrevivência de organismos aquáticos; b) regulação e acumulação de organismos patogênicos e substâncias químicas, contaminantes em fontes aquáticas destinadas ao consumo humano; c) a liberação de matéria orgânica biodegradável e nutriente, que estão sob condições quiescentes e podem resultar em eutrofização localizada, enriquecimento orgânico e depleção de oxigênio (Capuzzo, 1987 citado em Malins & Ostrander, 1991).

Vários estudos sobre os efeitos determinados de substâncias químicas sobre organismos aquáticos utilizam desde espécies do fitoplâncton até grandes mamíferos, como as baleias (Malins & Ostrander, 1991). A toxicologia aquática inicialmente focava principalmente o estudo com substâncias químicas tóxicas ao meio ambiente, entretanto, ocorreu a expansão destes estudos, e atualmente envolvem conversões metabólicas de

carcinógenos, modificações no DNA e outros processos bioquímicos distintos. Alguns sistemas bioquímicos dos organismos aquáticos são similares ao de animais terrestres, tal como o sistema que responde à substância estranha ao organismo e aquele responsável pelas oxidases de funções mistas. (Malins & Ostrander, 1991).

A contaminação dos recursos hídricos ocorre pela ação direta, ou seja, por meio de substâncias que são lançadas diretamente no ambiente, por exemplo, esgotos urbanos, efluentes industriais, algicidas e herbicidas aquáticos. De modo indireto por meio de substâncias lançadas no solo ou no ar que em função das chuvas ou infiltração podem atingir as águas, por exemplo, fertilizantes, agrotóxicos, depósitos de lixo e poluentes atmosféricos. As informações sobre a contaminação total das águas superficiais e seus efeitos biológicos não podem ser conhecidas. Nem todo composto orgânico presente na água pode ser qualificado, tornando-se necessário o desenvolvimento de novos testes biológicos para determinar a contaminação total e as vias mais sensíveis à contaminação (Deventer, 1996; Grisolia, 2005).

A ecogenotoxicologia aquática estuda a exposição de espécies aquáticas aos compostos genotóxicos, os quais aumentam o risco de câncer, toxicidade de embriões e efeitos teratogênicos. O potencial do impacto ecológico de cada efeito nos indivíduos pode levar a distúrbios na dinâmica da população e na comunidade, e dentre as implicações ecológicas associadas à genotoxicidade, a detecção e quantificação dos danos genéticos são mais interessantes para a realização de estudos ambientais (Nacci *et al.*, 1996).

Os agentes genotóxicos causam danos no DNA e caso não ocorra o reparo das lesões, pode ser iniciada uma cascata de conseqüências biológicas nas células, órgãos, no animal inteiro e finalmente atinge a população e comunidade do organismo. Estes danos, em uma variedade de animais aquáticos, estão associados à redução do crescimento corporal,

desenvolvimento anormal, diminuição da sobrevivência de embriões, larvas e animais adultos (Lee & Steinert, 2003).

Dentre os tipos de danos que podem ser produzidos pelos agentes genotóxicos estão incluídos as quebras nas fitas do DNA, modificação de bases, em sítios sensíveis a alcalinidade, alterações nos locais de ligação entre o DNA-DNA e entre o DNA-proteínas (Lee & Steinert, 2003).

A poluição das águas por compostos genotóxicos tem sido determinada pela execução de ensaios, como o teste Ames em amostras de água ou extratos (Omura *et al.*, 1992 citado em Deventer, 1996); os peixes e os moluscos também são utilizados como organismos teste (Scarpato *et al.*, 1992 citado em Deventer, 1996). Uma variedade de métodos foi desenvolvida para detectar os danos no DNA, entre eles o teste de micronúcleos (Lehmann, 1989 citado em Deventer, 1996), o de aberrações cromossômicas (Means *et al.*, 1989 citado em Deventer, 1996), o de troca de cromátides irmãs (Latt & Allen, 1977 citado em Lee & Steinert, 2003), os quais necessitam da proliferação celular. Entretanto, existem técnicas como a desenvolvida por Singh *et al.*, o teste de eletroforese em células isoladas, que detecta quebras simples no DNA, áreas sensíveis à alcalinidade e pode avaliar células em proliferação e não proliferativas (Monteith & Vanstone, 1995; Lee & Steinert, 2003).

### **3.2. Peixes como sistema teste animal**

Os peixes são amplamente utilizados em testes de toxicidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, pois possuem vantagens como: a biodiversidade em relação às outras espécies de vertebrados, à referência evolucionária em estudos com outros vertebrados, à ampla variedade de habitats que se classificam de água doce e salgada, oceanos polares ou em recifes tropicais, em águas superficiais ou em oceanos profundos com intensa pressão (Powers, 1989).

O uso de peixes como modelo animal em testes laboratoriais está aumentando principalmente por atributos positivos como: a) o pequeno tamanho do corpo; b) a existência de uma padronização e de técnicas válidas para as culturas em laboratório; c) o ciclo de vida relativamente rápido; d) a grande quantidade de informações existentes relacionadas aos atributos biológicos e toxicológicos básicos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Miracle & Ankley, 2005). Além do fato de que os peixes podem acumular substâncias químicas pela exposição direta aos poluentes presentes na água ou indiretamente pela cadeia alimentar do ecossistema em questão (Ateeq *et al.*, 2002).

Dados provenientes de análises toxicológicas em peixes são utilizados para uma variedade de programas regulatórios nos Estados Unidos, incluindo os registros de novos pesticidas, os critérios de qualidade da água no meio ambiente e testes para classificação de químicos específicos, como os desreguladores endócrinos (Miracle & Ankley, 2005). Além disso, é um bioindicador para estudos de monitoramento ambiental, para investigação em área poluída e não poluída; parâmetros de comunidades de peixes, a toxicidade do sangue do peixe, a toxicidade e análise química de sedimentos, dentre outras aplicações deste modelo (EPA, 2000).

Os peixes normalmente respondem aos compostos tóxicos em vias similares aos grandes vertebrados, assim podem ser utilizados em ensaios para testar substâncias químicas que são potencialmente teratogênicas e carcinogênicas para o homem. A utilização dos peixes como um sistema bioindicador tem apresentado resultados satisfatórios na avaliação dos efeitos de químicos contaminantes no meio ambiente aquático, incluindo rios, lagos e barragens (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Matsumoto & Cólus, 2000; Grisolia, 2005).

A escolha da espécie de peixe como bioindicador dependerá do conhecimento do poluente no ambiente aquático, se ocorre o depósito nos sedimentos, ou se permanecem na coluna de água, assim como a biologia e comportamento do animal. No caso de alguns

compostos como os organoclorados, que sofrem biomagnificação em cadeia ecológica, os peixes carnívoros são utilizados como melhores bioindicadores para avaliação do potencial de bioacumulação da substância (Grisolia, 2005).

As espécies *Oreochromis niloticus*, *Tilapia rendallii*, *Cyprinus carpio* e *Hoplias malabaricus* são excelentes sistemas teste para ensaios laboratoriais, com o objetivo de realizar pesquisas sobre a toxicidade de substâncias contaminantes em ambientes aquáticos (Nepomuceno *et al.*, 1997; Grisolia & Cordeiro, 2000; Gustavino *et al.*, 2001; Grisolia & Starling, 2001; Grisolia, 2002; Palhares & Grisolia, 2002; Ferraro *et al.*, 2004; Grisolia *et al.*, 2005; Arkhipchuk & Garanko, 2005; Porto *et al.*, 2005). O *Astyanax bimaculatus* (Lambari) também é muito utilizado em estudos de toxicologia, pois é uma espécie bastante comum, pequena, detritívora e com considerável importância econômica (Matsumoto & Cólus, 2000).

### **3.3. Lago Paranoá:**

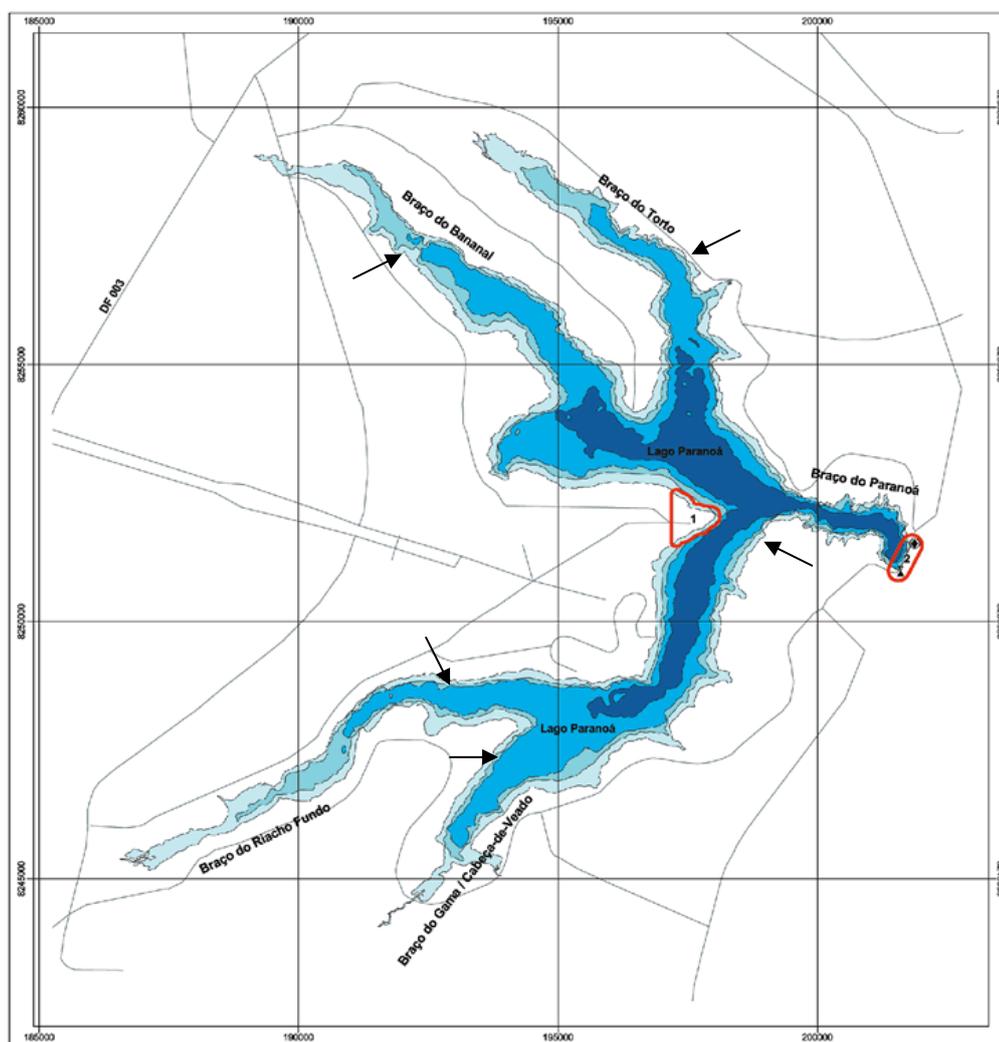
O Lago Paranoá está situado na zona urbana de Brasília, possui 38 Km<sup>2</sup> e está localizado entre as latitudes de 15°43'60'' e 15°50'50''S e entre as longitudes 47°47'30'' e 47°55'50''W. Sua bacia de contribuição drena 1.034,07 Km<sup>2</sup> e é formada por 21 córregos, com quatro tributários principais: Riacho Fundo, Ribeirão do Gama e Cabeça de Veado (mananciais do Lago Sul) e Ribeirão Bananal e Ribeirão do Torto (mananciais do Lago Norte). Cada um desses tributários forma um braço do lago. Além dos quatro braços, o lago possui uma zona central que pode ser subdividida em Zona Central Sul, Zona Central Norte e Zona da Barragem (figura 1) (Semarh, 2005).

O Lago Paranoá é um reservatório urbano com 40 anos de desenvolvimento. Ao longo deste período, quatorze espécies de peixes exóticas, originárias de outras bacias hidrográficas brasileiras foram progressivamente introduzidas no lago. Com o passar dos anos, aumentou o número de moradores residentes na Bacia Hidrográfica do Lago Paranoá, ocupando de forma

desordenada e progressiva, diversos pontos ao longo dos tributários formadores e às margens do lago (Semarh, 2005).

A urbanização gerou um excedente de lixo e esgoto não tratado, processos erosivos crescentes em sua bacia de drenagem e conversão irregular de veredas e matas de galeria, produzindo os efeitos crescentes de eutrofização e sedimentação dos tributários e da represa. Essa artificialização da paisagem provocou profundas transformações nos *habitats* aquáticos, nas condições físico-química das águas e nas relações entre as espécies de peixes com os ambientes aquático e terrestre circundante, tanto no corpo do reservatório, como nos tributários, a montante, e no Rio Paranoá, a jusante da barragem (Semarh, 2005).

O Lago Paranoá tem sido alvo de estudos para avaliar a boa qualidade do ecossistema. Caldas *et al.* (1999), avaliaram o nível de contaminantes organoclorados provenientes de inseticidas, verificando que os índices encontrados foram baixos, não causando riscos para a saúde de consumidores dos peixes. Além disso, foram desenvolvidos estudos com a finalidade de detectar a presença de metais pesados nos sedimentos do Lago Paranoá, que podem causar riscos aos organismos aquáticos do Lago Paranoá e estes estudos serviram como base metodológica, pois estabeleceram as faixas de concentração e relações de referências para inúmeros elementos químicos presentes nos sedimentos desta região (Moreira & Boaventura, 2003).

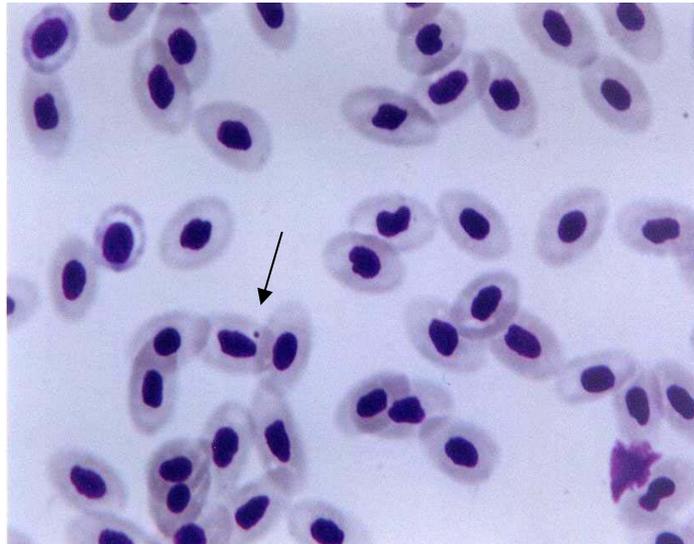


**Figura 1.** Figura do Lago Paranoá, onde podemos visualizar pelas setas os quatro pontos de coletas localizados nos braços do lago e um na zona central do lago. FONTE: Semarh, 2005.

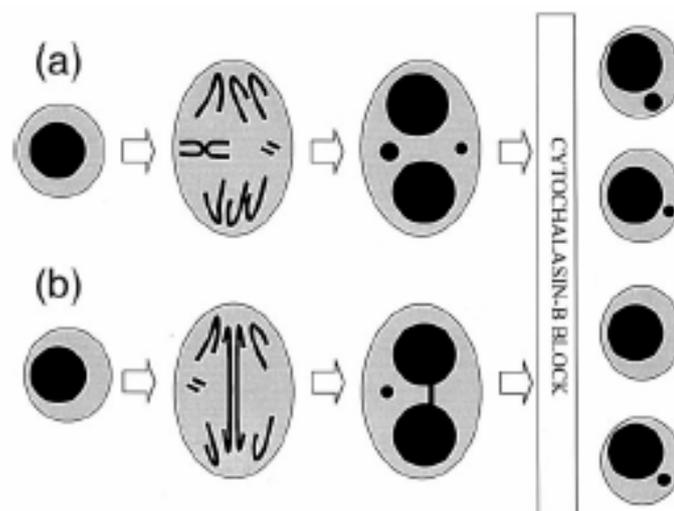
### 3.4. Avaliação da genotoxicidade e da toxicidade de substâncias químicas: Teste de Micronúcleo e Anomalias Nucleares

Os micronúcleos são massas de cromatina originada de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que se perdem durante a anáfase na divisão celular, devido aos eventos clastogênicos ou aneugênicos, também podem ser formados pela interação de agentes químicos, físicos e biológicos com estruturas não genômicas, que promovem distúrbios na maquinaria mitótica e falha na segregação dos cromossomos (figura 2). A ação dos agentes

pode originar os micronúcleos, um ou vários por célula, que resultam em fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em migração para os pólos da célula durante a anáfase figura 3 (Schimid, 1975; Rabello-Gay, 1991; Al-Sabti, 1995; Fenech, 2000; Souza & Fontanelli, 2006).



**Figura 2.** Micronúcleo em células de eritrócitos de sangue periférico de *Tilapia rendalli*, corados com Giemsa a 5%.



**Figura 3.** Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico. FONTE: Fenech, 2000.

O teste do micronúcleo é uma técnica vantajosa, pois pode ser usada em qualquer tipo de população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do animal (Hayashi *et al.*, 1998).

A técnica original desenvolvida por Schmid (1975) foi adaptada de roedores para a aplicação laboratorial em peixes por Hooftman & Raat (1982). São muitos os estudos que utilizam o teste do micronúcleo para detectar os efeitos da exposição de substâncias químicas mutagênicas e cancerígenas em peixes (Manna & Sadhukhan, 1986; Majone *et al.*, 1988; Missini & Lombi, 1997; Campana *et al.*, 1999; Gustavino *et al.*, 2001; Grisolia & Starling, 2001). Essa metodologia pode ser utilizada também *in situ*, como indicador biológico de poluentes em peixes (Missini *et al.*, 1996) e para avaliar os efeitos mutagênicos de substâncias como o mercúrio, cromo e outros agentes clastogênicos (Al-Sabti, 1994; Mersch *et al.*, 1996; Nepomuceno *et al.*, 1997; Matsumoto & Cólus, 2000; Grisolia & Cordeiro, 2000; Lemos *et al.*, 2001).

O teste do micronúcleo é um método amplamente utilizado para o monitoramento de danos genotóxicos em populações expostas à substâncias mutagênicas e carcinogênicas. A frequência de MN observada em um determinado momento pode ser considerada uma resposta complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste (Mersch *et al.*, 1996).

Comparando com os ensaios bactericidas ou *in vivo* de curto tempo de duração, o maior interesse no teste de micronúcleos *in vivo* é sua relevância ecogenotoxicológica, pois os organismos aquáticos testados são expostos diretamente na água (Mersch *et al.*, 1996).

No meio ambiente aquático, o teste pode ser aplicado principalmente em vertebrados como: as espécies de peixes *Cyprinus carpio* (Nepomuceno *et al.*, 1997), *Dreissena polymorpha* (Mersch & Beauvais, 1997) e *Umbra pygmaea* (Hooftman & Raat, 1982); e em larvas de anfíbios *Pleurodeles waltl*, *Ambystoma mexicanum* e *Xenopus laevis* (Fernandez *et*

*al.*, 1993). Os estudos com invertebrados de água doce e particularmente bivalves são raros, apenas um trabalho foi relatado usando o molusco *Anadonta cygnea* como organismo teste (Scarpato *et al.*, 1990 citado em Mersch *et al.*, 1996). Em contraste, os bivalves marinhos são amplamente utilizados para os estudos utilizando a técnica do micronúcleo, como *Mytilus galloprovincialis* (Majone *et al.*, 1988; Vernier *et al.*, 1997; Bolognesi *et al.*, 1999), *Mytilus edulis* (Wrisberg & Van der Gaag, 1992 citados em Mersch *et al.*, 1996), *Crassostrea virginica* (Weis *et al.*, 1995) e *Crassostrea gigas* (Burgeot *et al.*, 1995).

Durante as análises, alguns autores costumam observar as anomalias nucleares, sugerindo que essas anomalias sejam levadas em consideração durante a análise convencional de micronúcleos, pois podem estar relacionadas aos processos de citotoxicidade, ações sobre a divisão celular e a genotoxicidade ou mutagenicidade. Em peixes, algumas anomalias nucleares são registradas após a exposição a substâncias químicas ou poluentes da água (Souza & Fontanelli, 2006).

A formação de alterações morfológicas no envelope nuclear foi descrito por Carrasco *et al.*, 1990 citado em Souza & Fontanelli, 2006; como núcleo que apresenta uma pequena evaginação do envelope nuclear, o qual contém eucromatina (“blebbed”), núcleo apresentando evaginações maiores que o núcleo blebbed (“lobed”) e o núcleo apresenta um corte notável no conteúdo do material nuclear (“notched”) que também são relatados em eritrócitos de peixes como uma consequência da exposição destes animais à contaminantes químicos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos no meio ambiente, apesar dos mecanismos moleculares que levam a tais alterações nucleares ainda não tenham sido descritos (Palhares & Grisolia, 2002).

### 3.5. Teste do cometa

O teste do cometa proposto por Ostling & Johanson (1984), pode ser aplicado em uma série de estudos incluindo genética toxicológica, ecotoxicologia, em estudos de reparo de DNA e apoptoses. O método é simples, rápido e podem-se obter resultados em um dia (Sasaki *et al.*, 1997; Mitchelmore & Chipman, 1998; Lee & Steinert, 2003). Também é possível utilizar poucas células para a realização de um experimento e os mais diferentes tipos celulares podem ser utilizados nessa investigação, desde células vegetais, à de invertebrados e vertebrados. Como são visualizadas células isoladas é possível detectar diferenças intercelulares em resposta aos agentes que danificam o DNA (Lee & Steinert, 2003; Moller, 2005).

Em 1988, Singh *et al.* modificaram e aprimoraram o ensaio com a introdução de condições alcalinas desenvolvendo uma eletroforese de células isoladas, demonstrando desta maneira que a sensibilidade do teste está relacionada ao fato de ele detecta as quebras de fita simples do DNA, diferente dos testes citogenéticos que detectam quebras na dupla fita do DNA. A maioria dos laboratórios adotou estas modificações do ensaio do cometa para aplicar em testes de genética toxicológica (Moller, 2005).

Esta técnica possui um procedimento sensível para quantificar lesões no DNA em células individuais, tornando-se excelente para o biomonitoramento ambiental, pois é eficiente em detectar os efeitos de poluentes genotóxicos em águas superficiais e sedimentos (Pandurangi *et al.*, 1995; Mitchelmore e Chipman, 1998), pode ser utilizado para detectar quebras em fitas simples em baixos níveis de danos em células individuais (Deventer, 1996; Belpaeme *et al.*, 1996; Horváthová *et al.*, 1998; Mitchelmore & Chipman, 1998). O ensaio pode ser utilizado para avaliar danos em células eucarióticas em proliferação ou não, em sistemas celulares *in vivo* ou *in vitro* (Monteith & Vanstone, 1995; Sasaki *et al.*, 1997).

Os organismos aquáticos, como os peixes, acumulam poluentes diretamente da água ou indiretamente pelo alimento (Sasaki *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2004), portanto os eritrócitos destes animais são muito utilizados em estudos genotoxicológicos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Missini *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1998), como por exemplo, o estudo dos efeitos da exposição ao TBT (tributiltin) e ao Chumbo (Pb II) contaminado peixes neotropicais, *Hoplias malabaricus* (Ferraro *et al.*, 2004). Como também, para investigar os efeitos da exposição da espécie *Cyprinus carpio* em águas contaminadas com os produtos tóxicos de desinfetantes que contém cloro (Buchini *et al.*, 2004).

Lemos *et al.* (2005) utilizou a técnica do cometa para avaliar a qualidade da água do Lago Igapó II, na cidade de Londrina no Paraná, utilizando a espécie *Tilapia rendalli*. Este ensaio também é muito utilizado para a investigação de danos genéticos causados em peixes por poluentes ambientais (Bombail *et al.*, 2001). Sendo assim, é uma metodologia adequada para o biomonitoramento da genotoxicidade no ambiente aquático, utilizado tanto para peixes como outros organismos para detectar os danos no DNA induzidos pela ação direta de mutágenos e pró-mutágenos dissolvidos na água (Nacci *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1997; Mitchelmore & Chipman, 1998; Hayashi *et al.*, 1998; Lee & Steinert, 2003; Russo *et al.*, 2004; Villela *et al.*, 2006).

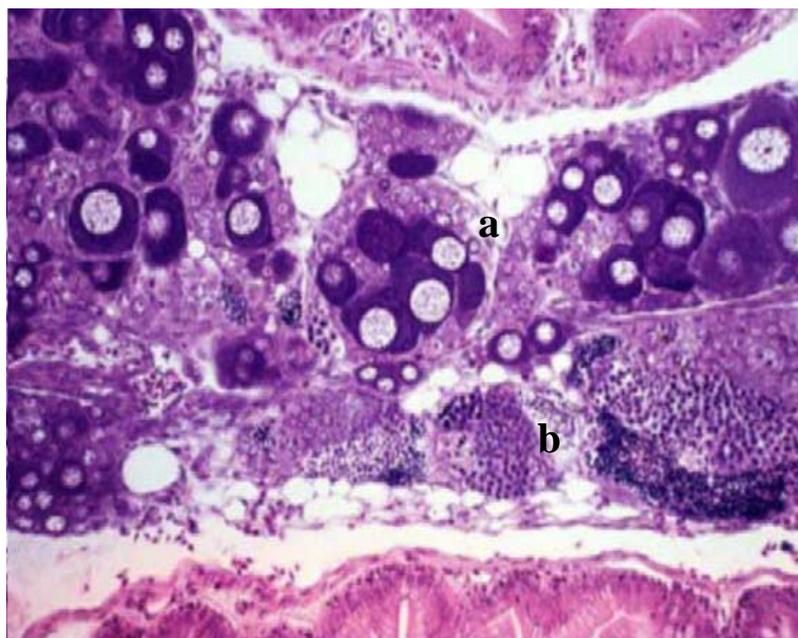
Quando o ensaio do cometa é comparado a outras técnicas para detectar lesões no DNA de organismos aquáticos causadas por agentes genotóxicos, como o teste do micronúcleo, o método de eluição alcalina, aberrações cromossômicas, dentre outros, os resultados indicam que o teste do cometa é bastante sensível (Belpaeme *et al.*, 1996; Lee & Steinert, 2003; Ferraro *et al.*, 2004). Entretanto, na literatura, o teste do cometa é muito utilizado em conjunto com outros testes (micronúcleo) para a avaliação de estudos genotoxicológicos usando o peixe como bioindicador (Bealpaeme *et al.*, 1996; Ferraro *et al.*, 2004; Buchini *et al.*, 2004).

### 3.6. Desreguladores endócrinos:

Os chamados desreguladores endócrinos são substâncias, que mimetizam efeitos dos hormônios, podendo interagir com receptores específicos, desencadeando as alterações morfofisiológicas na célula-alvo, semelhantemente ao hormônio original. Podem bloquear a ação hormonal ao ocupar os receptores. Conseqüentemente alteraram o metabolismo de células, tecidos e órgãos, comprometendo as suas funções (Sumpter, 1998; Sone *et al.*, 2004; Grisolia, 2005).

No ambiente essas substâncias podem alterar o comportamento reprodutivo de várias espécies gerando queda da fertilidade (Grisolia, 2005; Leino *et al.*, 2005). O grupo principal de desreguladores endócrinos é aquele que mimetiza as atividades estrogênicas e inclui os hormônios sintéticos, fito-estrogênicos, várias substâncias industriais, pesticidas, entre outros. Devido aos seus efeitos adversos sobre a vida selvagem, os desreguladores têm recebido bastante atenção. Alguns exemplos são os pseudoestrogênicos ( $\beta$  hexaclorociclohexano, flutamida, vinclozolin, phtalate, 17  $\beta$  estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, etc), Androgênicos (17 $\alpha$  metyldihydrotestosterone, TBT, 17 $\alpha$  ethynyltestosterone, 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione, tributyltin oxide/TBTO, etc) e os inibidores dos hormônios da tireóide (Metyl bromido, propylthiouracil, etc) (Wester *et al.*, 2004).

Os estrógenos são conhecidos por exercerem vários efeitos metabólicos e endócrinos em espécies de mamíferos e em outras. Alguns de seus efeitos são mimetizados pelos pseudoestrógenos como, por exemplo, o  $\beta$  hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH) e o nonilfenol. Em estudo com peixes (*Poecilia reticulata*, *Oryzias latipes* e *Brachydanio rerio*), foram observados efeitos como a inibição da maturação de ovócitos, a intersexualidade (figura 4), alterações pituitárias e indução de vitelogenese tanto em machos como em fêmeas (Kashiwada *et al.*, 2002; Wester *et al.*, 2004).



**Figura 4.** Indução de intersexo em machos de medaka (*Oryzias latipes*) após exposição ao  $\beta$ -HCH. A figura mostra a presença de ovócitos e túbulos espermáticos na mesma gônada. (a) ovócitos tipo II, demonstrando presença de gônada feminina; (b) cistos de espermátides, mostrando a presença da gônada masculina. FONTE: Wester *et al.*, 2004.

Estudos demonstraram que alguns compostos químicos utilizados em processos industriais, na produção de papel e em estações de tratamento de esgoto, interferem no funcionamento endócrino de algumas espécies do ambiente aquático. A exposição crônica aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados e policlорinados bifenóis prejudicam a capacidade dos peixes em secretar cortisol em resposta aos hormônios adrenocorticotrópicos (Brodeur *et al.*, 1997; Girard *et al.*, 1998; Norris *et al.*, 1999 citados em Bisson & Hontela, 2002).

Em 1996, em um congresso nos Estados Unidos passou a requerer uma legislação à Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para desenvolver um protocolo para testar classes específicas de desreguladores endócrinos. Em particular, a agência centralizou suas atenções nos compostos químicos com ação potencial na reprodução e desenvolvimento,

por meio das alterações dos processos controlados pelo estrogênio, androgênio e hormônios da tireóide (USEPA, 1998 citado em Leino, *et al.*, 2005).

Propuseram testes divididos em três etapas, iniciando com a classificação do potencial dos compostos químicos para estudos de avaliação da atividade biológica. (1). estudos que propõe uma avaliação rápida e comparativa. (2). avaliando o ciclo de vida de forma mais extensiva. (3) utilização de mamíferos, ou anfíbios como modelos para detectar o potencial do desregulador endócrino na reprodução (USEPA, 1998 citado em Leino *et al.*, 2005).

### **3.7. Nonilfenol etoxilado**

O nonilfenol etoxilado é um contaminante ambiental com efeitos estrogênicos, isto é, uma substância que mimetiza a ação do estrogênio ou bloqueia os hormônios endógenos esteróides através da interação com os receptores (Sone *et al.*, 2004).

Este composto é amplamente utilizado em manufaturas de surfactantes não-iônicos, aditivos de lubrificantes, polímeros estabilizadores, antioxidantes e químicos alquilfenol, componente de detergentes, tintas, adesivos e diversos tipos de agrotóxicos, como inseticidas e herbicidas (Sakai, 2001; Kim *et al.*, 2002; Uguz *et al.*, 2003; Sone *et al.*, 2004).

Sabe-se que os alquifenois no meio ambiente são originados principalmente da degradação de alquifenois polietoxilados (APEOs), os quais são utilizados como surfactantes não iônicos ou como detergentes em indústrias e no ambiente doméstico nas últimas quatro décadas. O nonilfenol polietoxilado (NPEO) é o APEO mais amplamente produzido, aproximadamente 80% são NPEO. Eles são frequentemente lançados no meio ambiente através das estações de tratamento de água devido a suas características de uso (Li *et al.*, 2004).

Os NPEO são degradados a nonilfenol rapidamente no meio ambiente pelos mecanismos de biodegradação e fotodegradação como outros APEOs (Jonkers *et al.*, 2005).

O nonilfenol é utilizado em testes como indutor de anomalias no desenvolvimento de alguns organismos, como no caso de embriões de *Xenopus laevis* (Sone *et al.*, 2004). Este composto pode causar alterações em diversos órgãos, como nos rins e em órgãos responsáveis por todo o processo reprodutivo, alterando até mesmo os níveis de hormônios como o LH e o FSH (Nagao *et al.*, 2001). O nonilfenol pode acelerar a puberdade de ratos, alterando o ciclo estrogênico em fêmeas (Kim *et al.*, 2002).

Numerosos resultados experimentais com compostos estrogênicos indicam que os alquifenois, incluindo os nonilfenois, induzem efeitos negativos à saúde humana e a vida selvagem por meio de vias de contaminação como a água, alimentos, ar e pele. Desta maneira, ocorre a disrupção do sistema endócrino, onde os alquifenois são metabolizados pelo fígado e excretados através da bile e da urina (Jager, 2001; Uguz *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

As coletas foram iniciadas no dia 28 de março de 2005, no período da estação chuvosa e terminou em setembro de 2005 no período da estação seca. Os peixes foram coletados em cinco pontos específicos do Lago Paranoá: ETE norte, Setor de Mansões do Lago Norte, ASSTJ na Asa Sul, Ermida Dom Bosco e na QL – 16 em um posto de bombeamento da CAESB no Lago Sul. Os pontos estão localizados nos quatro braços do lago (do Torto, Bananal, Riacho Fundo e do Gama) e um ponto na zona central.

As coletas ocorreram em ciclos de 24 horas, com intervalos de 6 horas entre as campanhas, sendo a primeira as 16:00 h e a última as 10:00 horas.

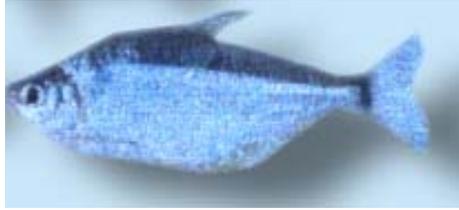
As redes dispostas nas margens do lago pela CAESB, apresentavam tamanhos diferentes de perímetro de malhas, que eram de 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12 e 14 cm entre nós opostos, para a obtenção de um novo levantamento das espécies de peixes do lago.

No local de coleta um especialista em peixes do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) identificava as espécies (figura 5 a 11). As espécies coletadas para esse estudo foram: *Geophagus brasiliensis* (acará amarelo – figura 5), *Cichla temensis* (tucunaré – figura 6), *Hoplias malabaricus* (traíra – figura 7), *Astyamx binaculatus lacustres* (lambari – figura 8), *Oreochromis niloticus* (tilápia – figura 9), *Cyprinus carpio* (carpa – figura 10) e *Steindacnerina insculpita* (sagüiru – figura 11).



**Figura 5.** Espécie *Geophagus brasiliensis* conhecida popularmente por Acará amarelo.

FONTE: Semarh, 2005.



**Figura 6.** Espécie *Astyamax binaculatus lacustres*, mais conhecido como Lambari. FONTE: Semarh, 2005.



**Figura 7.** Espécie *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecida como Traíra. FONTE: Semarh, 2005.



**Figura 8.** Espécie *Steindacnerina inculpita*, popularmente conhecida como Sagüiru. FONTE: Semarh, 2005.



**Figura 9.** Espécie *Cyprinus carpio*, também conhecida como Carpa. FONTE: Semarh, 2005.



**Figura 10.** Espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como Tilápia. FONTE: Semarh, 2005.



**Figura 11.** Espécie *Cichla temensis*, também conhecida como Tucunaré. FONTE: Semarh, 2005.

Quatro espécies nativas (Acará, Lambari, Traíra e Sagüiru) e três são exóticas (Tilápia, Carpa e Tucunaré). As espécies possuem hábitos alimentares diferentes como carnívoros (Tucunaré e Traíra), algívoros (Carpa) e onívoros (Tilápia, Acará, Lambari e Sagüiru).

As coletas do sangue foram realizadas em campo, durante o primeiro período de coletas realizado na estação chuvosa, o material coletado foi processado para a realização do teste do micronúcleo e no período da estação seca, as amostras foram processadas para a realização do teste do cometa.

#### **4.1. Teste de micronúcleo:**

O teste do micronúcleo em peixes é similar ao teste em mamíferos (Schmid, 1975) e foi adaptado para as características do organismo-teste baseado em protocolos descritos em outros experimentos realizados com peixes (Hooftmann & Raat, 1982; Grisolia, 2005).

O sangue periférico foi coletado com seringas heparinizadas. As lâminas de esfregaço foram feitas no local de coleta com aproximadamente uma gota de sangue (50 µL) de cada espécime, em seguida as lâminas foram levadas para o Laboratório de Genética da UnB, onde ficaram secando por 24 horas em temperatura ambiente. O material foi então fixado em metanol por 15 minutos e corado com Giemsa a 5% para serem analisadas em microscópio de luz em objetiva de 100x onde foram analisadas 3000 células por animal.

Segundo Fenech (2000) existe uma classificação a ser considerada para a realização da análise do micronúcleo. Desta maneira, o critério utilizado para identificar os eritrócitos micronucleados foi o seguinte:

1. o micronúcleo deve ser um terço menor que o núcleo principal;
2. um micronúcleo não deve tocar no núcleo principal e;
3. um micronúcleo não deve refringir, ou seja, a mesma coloração e deve ter a mesma intensidade do núcleo principal.

As médias de micronúcleos obtidas em cada espécie foram comparadas entre si e analisadas estatisticamente pelo método Mann-Whitney's *U* - test ( $\alpha = 0,05$ ).

Nas mesmas lâminas preparadas para avaliação da genotoxicidade do teste de micronúcleo foi analisada a citotoxicidade através das anomalias nucleares, onde foram contadas células binucleadas, células com núcleos "bleebed", "lobed" e "notched" em 1000 células de cada indivíduo. A frequência das médias e os valores dos desvios padrões para células binucleadas e aquelas com alterações morfológicas foram classificadas de acordo com Souza & Fontanetti (2006), foram calculadas dentro de cada grupo de espécie. Deve-se lembrar que a origem das alterações na morfologia do núcleo ainda não é conhecida, logo foi interpretado como um grupo único para a análise estatística, sendo adotado o teste não paramétrico Mann Whitney-*U*.

#### 4.2. Teste do Cometa:

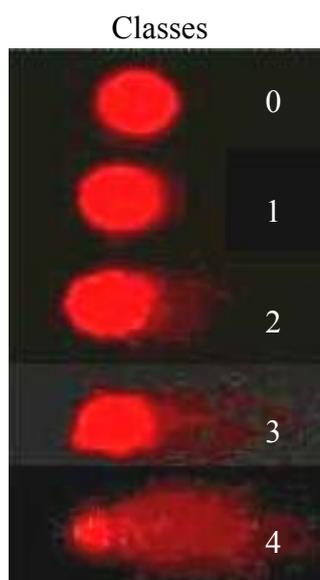
O teste foi realizado segundo a técnica descrita por Singh *et al.* (1988), com algumas modificações para adaptar a técnica para peixes, de acordo com o protocolo abaixo:

1. lâminas de 26 x 76 mm foram imersas em um recipiente contendo agarose com ponto de fusão normal diluída em tampão PBS-tampão fosfato (NaCl 1,5 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M; NaN<sub>3</sub> 0,02%, pH 7,2) a 1,5% e depois mantidas à temperatura ambiente, pelo período de 12 horas para secagem da agarose.
2. 120 µL de *Low melting point agarose* (LMP) a 0,5%, diluído em tampão PBS e aquecido a 37°C em banho-maria, foram rapidamente misturados a 10 µL da amostra de sangue (50 µL) diluído em um ependorf contendo 500 µL de soro HAM – F10. Imediatamente após este procedimento, 120 µL dessa mistura foram gotejados em uma lâmina preparada de acordo com o item anterior. Uma lamínula foi acoplada e o conjunto levado à geladeira;
3. após 5 minutos na geladeira, a lamínula foi removida e as lâminas mergulhadas em um Koplín coberto com papel alumínio, contendo solução de lise final gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1X de Triton X-100);
4. após pelo menos uma hora imersas no tampão de lise a 4°C, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese contendo tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1mM EDTA) fresco, pH 13. Após 30 minutos em repouso, procedeu-se a eletroforese a 25 V e 300 mA por um período de 30 minutos;
5. após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com solução neutralizadora (0,4M Tris, pH 7,5). Esse processo foi repetido por três vezes em intervalos de 5 minutos;
6. o material neutralizado foi fixado em etanol 100% por 5 minutos e em seguida, deixado para secar em temperatura ambiente.

7. a coloração dos nucleóides foi feita gotejando-se sobre as lâminas 30  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de Brometo de Etídio (20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  – solução estoque 10X)

A contagem de 100 células por animal foi efetuada em teste cego ao microscópio de fluorescência Axioskop-II Carl Zeiss, filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x .

Desta maneira, foi feita a caracterização do tamanho e integridade da cauda do cometa que representa os níveis de lesões no DNA, que ocorrem nos eritrócitos do sangue periférico coletado das diversas espécies de peixe do Lago Paranoá. Deste modo, as células foram classificadas em classes de 0 a 4, segundo seu grau de lesão, conforme a figura 12.



**Figura 12.** Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.

Para a quantificação do dano no DNA, o escore total para 100 células analisadas variou de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 400 (dano máximo = todas as células com dano de classe 4) (Jaloszynski, 1999), sendo empregada a fórmula:

$$ID (ua) = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

Onde,

ID = índice de danos no DNA;

ua = unidade arbitrária;

N1 –N4 = nucleóides nas classes 1, 2, 3 e 4;

S = número de nucleóides analisados, incluindo os da classe 0.

O resultado da análise estatística foi obtido por meio de um programa de software denominado MINITAB, onde foi aplicada a análise de variância ANOVA e significância de Tukey 95%.

#### **4.3. Avaliação genotóxica e de alterações gonadais causadas pelo nonilfenol etoxilado em *Oreochromis niloticus*.**

Os peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, utilizados para os experimentos foram obtidos na Estação de Piscicultura do Governo do Distrito Federal, pois às condições da criação são controladas e monitoradas constantemente. Os peixes foram selecionados com tamanho padrão variando entre 7 e 10 cm. Foram aclimatados no laboratório de genética da UnB, por uma semana em tanques de amianto revestidos com tinta epóxi com capacidade de volume de 250 litros, aerados constantemente com água declorificada. Os peixes foram mantidos em temperatura de aproximadamente  $26 \pm 2$  °C, permanecendo em aeração e filtração constantes e alimentados com a ração para peixes. A quantidade de amônia dissolvida na água foi monitorada constantemente, e assim que atingia níveis indesejáveis, a água dos tanques era substituída, por água declorificada e filtrada.

O nonilfenol etoxilado foi cedido pela Empresa BASF, com o nome comercial de RENEX 95% - RED 1160, lote 970919-202.

Para determinar o efeito genotóxico do NP foi realizado o teste do micronúcleo e cometa, seguindo metodologia descrita no tópico acima.

Antes de avaliar o potencial do nonilfenol em causar alterações gonadais, foi determinada a concentração letal para 50% dos animais (CL 50%), usando o método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Inicialmente 10 peixes foram mantidos por 72 horas em quatro concentrações diferentes do nonilfenol (0; 0,01; 0,1; 1 mL/L). Após a determinação da curva de sobrevivência os animais foram submetidos a novos experimentos.

O teste para verificar as alterações gonadais causadas pelo NP foi montado no Laboratório de Genética, onde 10 peixes por aquário, foram submetidos a duas concentrações diferentes do NP (1 e 10µL/L) e em um experimento paralelo, mais 10 peixes foram submetidos a concentração de 16µL/L, ambos com seus respectivos controles, ficando expostos aos tratamentos por 72 horas.

Após o tratamento, as gônadas foram retiradas, fixadas com o fixador Davidson por 24 horas, seguindo-se então o protocolo de rotina de clarificação, inclusão e coloração histológica.

1. As gônadas foram colocadas em cassetes e mergulhadas em álcool 70% após as 24 horas, são imersas no fixador Davidson;
2. Após 24 horas, coloca-se em álcool 80%, 90%, 100% I, 100% II, 100% III, cada um por 40 minutos.
3. Na etapa da clarificação o xilol foi aplicado duas vezes por 20 minutos cada;
4. Para a inclusão, o material foi mergulhado em parafina tipo I, II e III por 40 minutos em cada tipo;
5. Na etapa da coloração, a seqüência nas cubas com o tempo determinado: xilol I, xilol II, álcool 100 I, álcool 100 II, álcool 100 III, álcool 90, álcool 80, álcool 70 (todos por 1 minuto). Em seguida as lâminas ganham um banho de água para completar a

hidratação do material e são colocadas em uma cuba contendo hematoxilina por 40 segundos.

6. As lâminas recebem um banho de água de aproximadamente 1 minuto para extrair o excesso de hematoxilina e são colocadas em uma cuba contendo eosina por mais 40 segundos.
7. Após o banho na eosina, retira-se o excesso desta substância com água e inicia-se o processo de desidratação, começando com o álcool 70, seguido por álcool 80, álcool 90, álcool 100 I, álcool 100 II, álcool 100 III, xilol I e xilol II.
8. Após a desidratação o material é montado, fixando-se a lamínula com acrílex e deixa-se o material secar em estufa à 50°C por aproximadamente 1 hora.

Os ovócitos da espécie *O. niloticus* apresentam desova parcelada e para classificar os tipos de ovócitos utilizou-se a seguinte escala de maturação:

**OVÓCITO I:** As secções histológicas mostravam ovócitos e ovogônias ocupando virtualmente toda a extensão do corte, pequenos e com núcleo grande circundado por citoplasma delgado levemente basófilo. O nucléolo era grande e, geralmente, único; os ovócitos tinham tamanhos variados, forma esférica e poligonal.

**OVÓCITO II:** (em repouso) Havia predomínio de ovócitos poligonais organizados em lamelas que se projetavam da parede das gônadas e fortemente basófilos, com núcleo relativamente grande, nucléolos numerosos e periféricos; algumas ovogônias foram observadas.

OVÓCITO III: (maturação) Nessa fase as gônadas eram mais volumosas. Além dos ovócitos descritos no estágio II, havia ovócitos maiores, que apresentavam citoplasma com basofilia moderada, grande número de vesículas periféricas e nucléolos em grande número; havia, também, ovócitos ainda maiores, com deposição de grânulos de vitelo em extensões variáveis, sugerindo a função de fixação do folículo ovariano no ambiente.

OVÓCITO IV: (desovando) Nessa fase os ovócitos eram grandes e abundantes; na extensão das gônadas apareceram espaços gelatinosos, em fêmeas que já haviam eliminado muitos ovócitos, os quais, além de grandes, eram repletos de vitelo, tinham o núcleo amorfo e ocupavam quase todo o ovário. Havia ovócitos poligonais, similares aos do estágio II (repouso), preenchendo os interstícios deixados pelas células anteriores. Foram observados, também, folículos vazios.

OVÓCITO V: (esgotado) Nessa fase os ovócitos eram grandes, repletos de vitelo e continham grande número de ovócitos vitelinados em absorção.

O material foi analisado em microscópio de luz no aumento de 40, 100 e 400x para determinação do estágio de maturação. Para determinar se os indivíduos estão em estágio reprodutivo ou não reprodutivo foi empregada a escala de maturação como descrita abaixo:

**a. Escala de maturação em fêmeas:**

Os estádios considerados microscopicamente consistem em: Imaturo, maturação inicial, maturação avançada, maduro, parcialmente desovado/ desovado, em recuperação e recuperado.

Imaturo: Microscopicamente, observam-se apenas Ovócitos tipo I (OI) e OII, sendo que os OI apresentam-se em ninhos, na maioria das vezes.

Maturação inicial: Em cortes histológicos, observam-se OII e alguns III.

Maturação avançada: Apresentam alguns ovócitos tipo II, III e alguns IV.

Maduro: Microscopicamente, a espécie apresentou OII, OIII, OIV e OV.

Semidesovado: Nos cortes histológicos são visíveis OII, OIII, OIV e folículos pós ovulatórios.

Recuperação: Predomínio de OII, ovócitos vitelogênicos em absorção, cicatrizes de folículos e ainda desorganização tecidual.

Recuperado: Microscopicamente são identificados pelo predomínio de OII, pelas ovulígenas distendidas e pela presença eventual de cicatrizes de folículos.

#### **b. Escala de maturação para machos:**

Imaturo: os testículos são constituídos pelas espermatogônias, envoltas pelo abundante tecido conjuntivo, dispersas ou formando alguns poucos túbulos seminíferos.

Maturação: os túbulos seminíferos já estão definidos e podem ser observadas células germinativas nas diferentes fases de espermatogênese. Inicialmente ocorre o aumento na quantidade de cistos com espermatogônias secundárias.

Maduro: Os túbulos possuem ampla luz e preenchida por espermatozóides. Poucos cistos são observados. O tecido conjuntivo que reveste os túbulos é escasso.

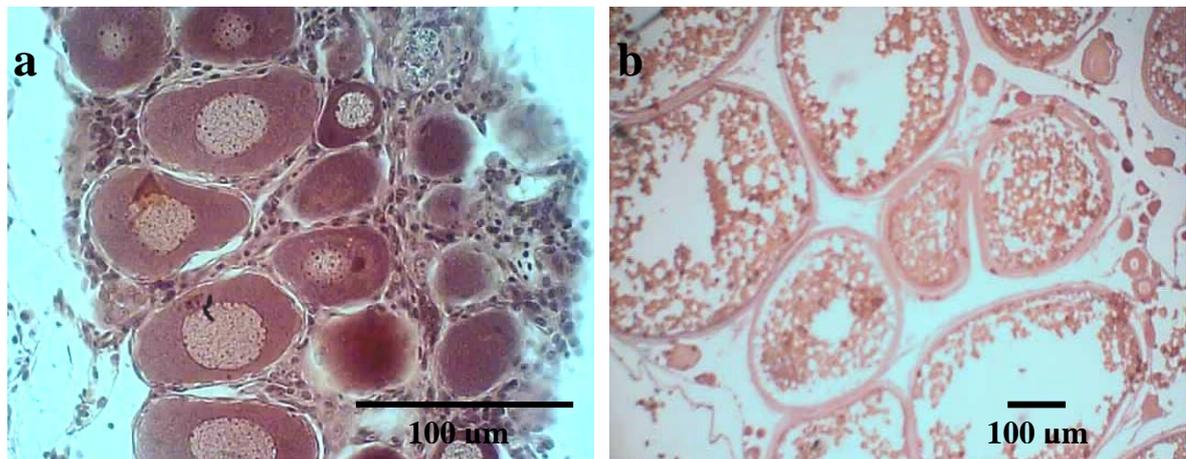
Semi-esgotado: A principal característica é a presença de túbulos seminíferos com espermatozóides sendo escoados.

Esgotado: A estrutura dos túbulos apresenta-se em menor tamanho e estão esvaziados, poucos espermatozóides, o epitélio germinativo é escasso e os cistos ausentes.

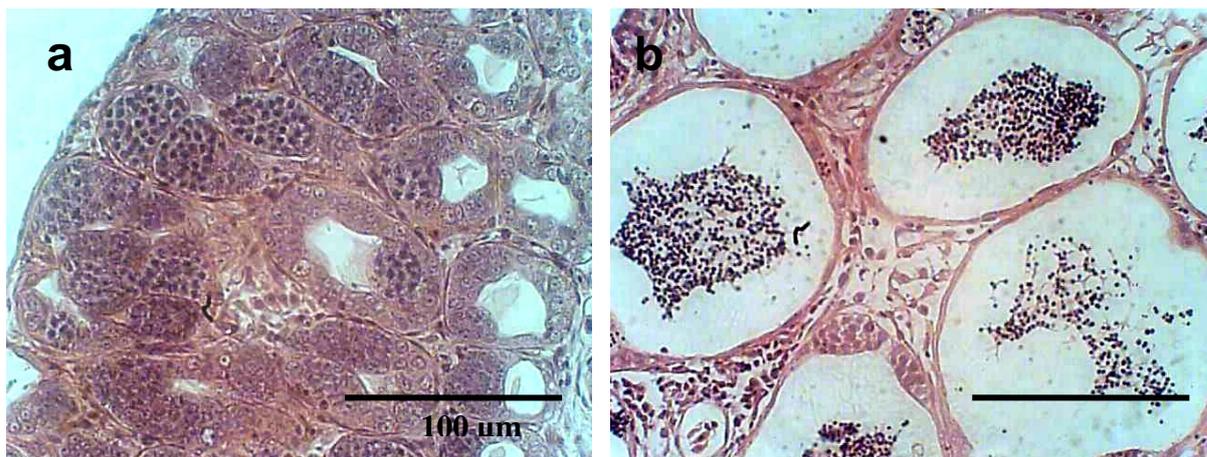
Recuperação: Os túbulos apresentam um aspecto regular, pequeno tamanho, revestimento de espermatogônias, ou se apresentam esvaziados com epitélio germinativo baixo, com aspecto irregular e com raros espermatozóides.

Recuperado: Os túbulos são homogêneos, com pequena luz e revestidos por espermatogônias. Podem ser encontrados poucos cistos de espermatogônias secundárias.

Foram considerados como reprodutivos os seguintes estádios: maturação avançada, madura e semi-desovado (fêmeas) (figura 13) e maturação, maduro e semi-esgotado (machos). Os demais estádios foram considerados não reprodutivos (figura 14).



**Figura 13.** Foto de microscopia de gônadas de fêmeas da espécie *O. niloticus*, onde podemos visualizar um indivíduo em maturação inicial, classificado como em período não reprodutivo, aumento de 400x (a); indivíduo maduro, classificado como indivíduo em período reprodutivo, aumento de 40x (b).



**Figura 14.** Foto de microscopia de gônadas de machos da espécie *O. niloticus*, onde podemos visualizar um indivíduo em recuperação, classificado como em período não reprodutivo (a); indivíduo semi-esgotado, classificado como indivíduo em período reprodutivo (b). Aumento de 400x.

Os campos analisados foram fotografados com câmera digital (DCM35 para microscópio CE) e avaliados de acordo com os estádios de maturação, sempre em relação ao controle negativo.

A morfometria foi realizada de acordo com o programa Image-pro Plus 5.1, onde foram selecionados 30 ovócitos em nível V, de cada concentração de nonilfenol e do controle, para a realização da análise comparativa do diâmetro dos ovócitos. Os dados da morfometria foram analisados estatisticamente através do teste Mann Whitney – U, levando em consideração o nível de significância de 5%.

#### **4.4. Teste para determinação de efeitos adversos em tecido gonadal. Avaliação dos efluentes finais das ETEs**

Avaliação do potencial dos efluentes finais das ETE Norte e ETE Sul (Figura 15) sobre as gônadas de *Oreochromis niloticus*. Após a aclimação dos animais as condições do laboratório, os peixes foram transferidos para aquários de vidro, em grupos de 10, com

aeração constante e então expostos por 72 h ao efluente final coletado nas estações de tratamento sem qualquer diluição. Os animais foram expostos ao efluente da ETE Norte e da ETE Sul em momentos diferentes, juntamente com os seus respectivos controles. Após o período de exposição, realizou-se a coleta das gônadas seguindo-se o procedimento histológico e análises como descrito no tópico acima.



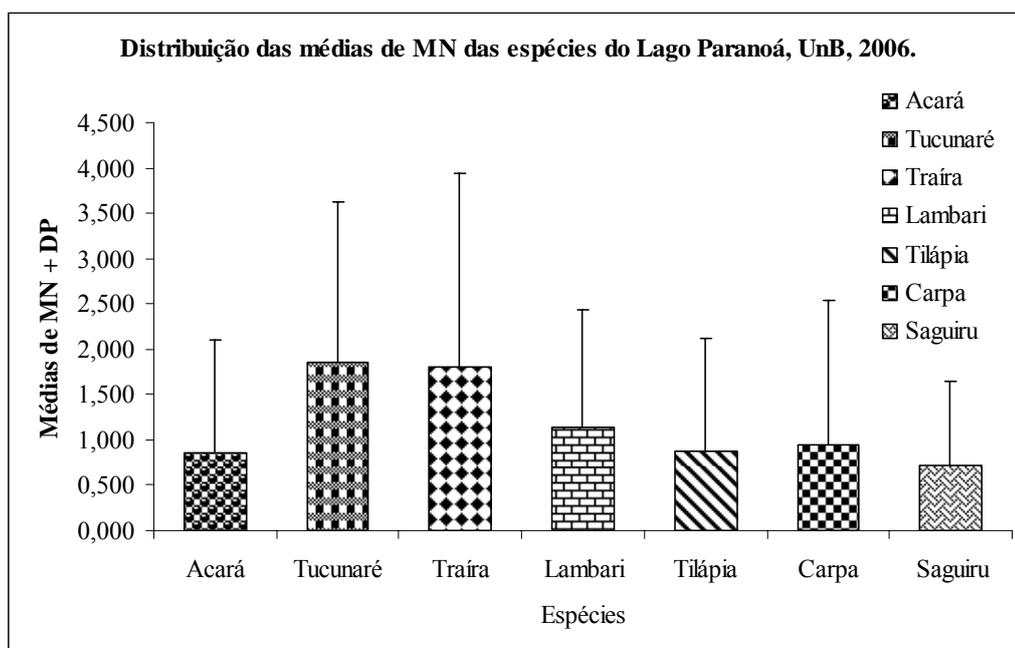
**Figura 15.** Tanque de escoamento do efluente final das estações de tratamento de esgoto, onde foi realizada a coleta.

## **5. RESULTADOS**

## 5.1. Avaliação genotóxica das espécies do Lago Paranoá.

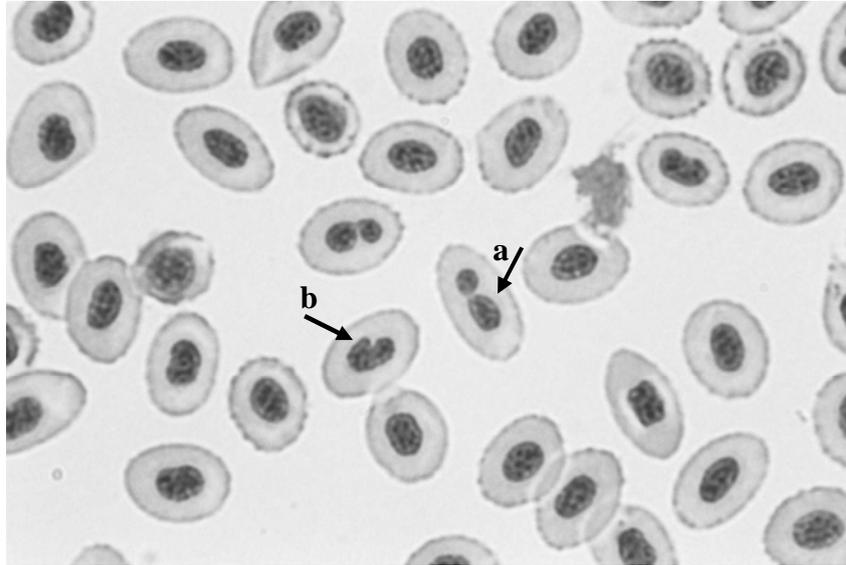
### 5.1.1. Teste do Micronúcleo e Anomalias Nucleares.

Dentre as espécies coletadas para avaliação genotóxica das águas do Lago Paranoá, a espécie *Cichla temensis* (tucunaré) foi a que apresentou a maior frequência de micronúcleos (média de  $1,863 \pm 1,753$ ) em relação às outras espécies coletadas (figura 16), por outro lado, o Acará alcançou a menor média ( $0,863 \pm 1,245$ ) dentre as outras espécies. Através do cálculo das médias, realizamos o teste estatístico de Mann-Whitney *U* considerando o nível de significância de 5%, para verificar a diferença entre as médias das espécies estudadas (anexo 1). O teste estatístico, registrou um resultado significativo entre as médias de MNs das espécies: *Cichla temensis* (tucunaré) e *Hoplias malabaricus* (traíra) quando relacionados com as espécies *Geophagus brasiliensis*, *Oreochromis nilotica*, *Cyprinus carpio* e *Steindacnerina insculpta*, apresentando  $P < 0,05$ . Entretanto, as outras espécies não apresentaram diferenças significativas entre as frequências de micronúcleos quando comparadas entre si, com o  $P > 0,05$ .

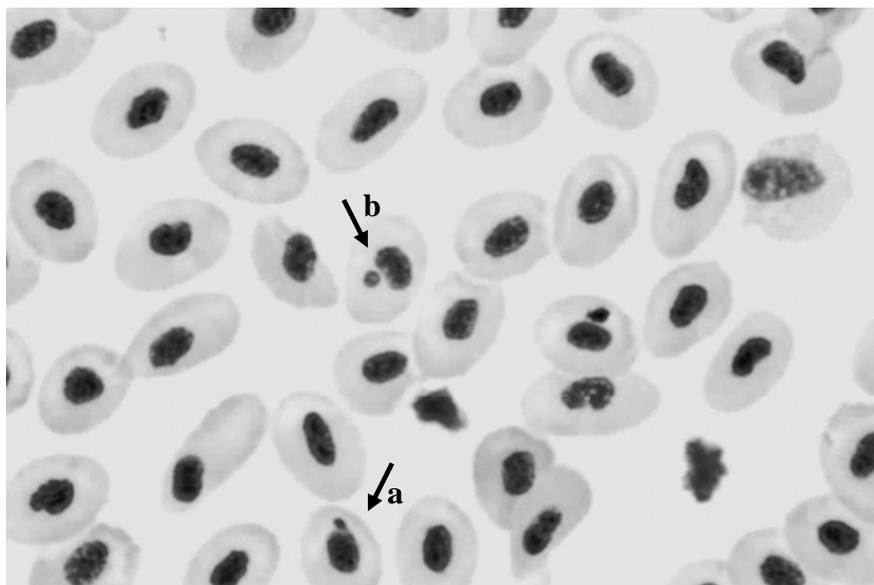


**Figura 16.** Gráfico da distribuição das médias e desvios padrões dos micronúcleos encontrados nas espécies de peixes estudadas do Lago Paranoá, DF, 2006.

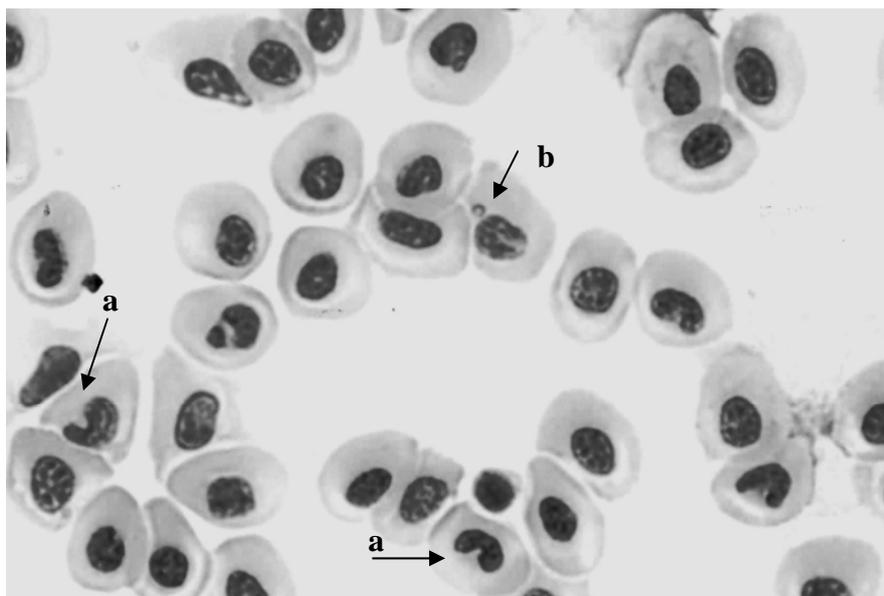
As anormalidades nucleares registradas neste estudo foram células binucleadas e eritrócitos com alterações na morfologia nuclear como o “blebbed” (figura 17), “lobed” (figura 18) e “notched” (figura 19).



**Figura 17.** Foto de microscopia de eritrócitos de peixe mostrando uma célula binucleada (seta a) e uma célula com núcleo “blebbed” (seta b).



**Figura 18.** Foto de microscopia de eritrócito de peixe mostrando uma célula com núcleo com anomalia do tipo “lobed” (seta a). Na seta b, podemos visualizar um micronúcleo.



**Figura 19.** Foto de microscopia onde podemos observar eritrócitos de peixe com alterações nucleares do tipo “notched” (setas a) e uma célula com micronúcleo (seta b).

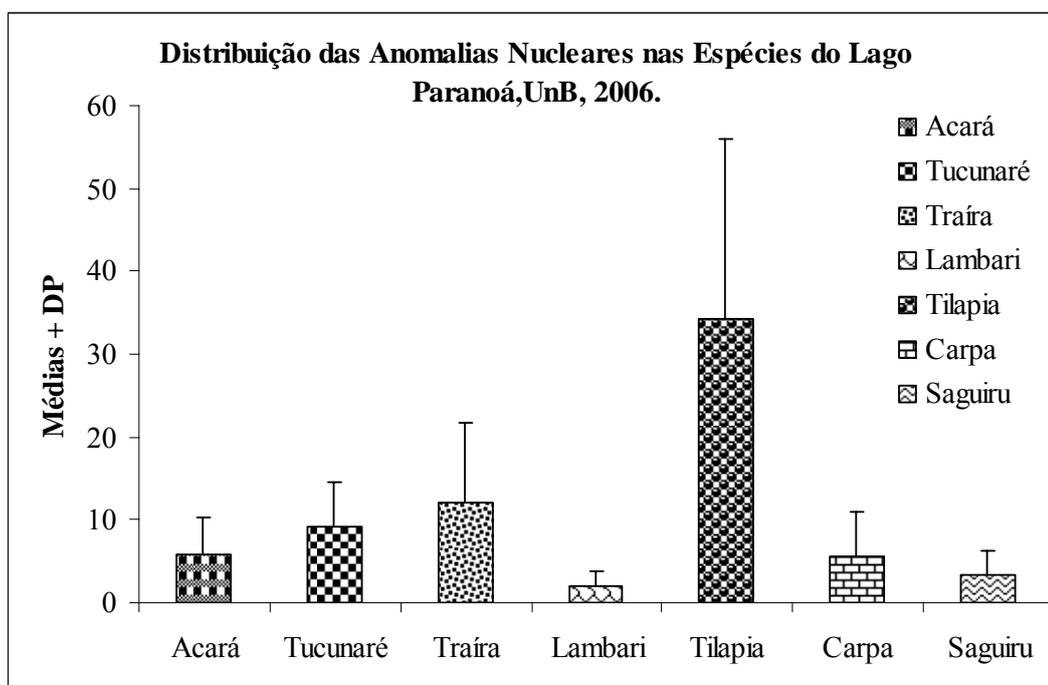
Na tabela 1, estão representados os valores das médias e desvios padrões calculados a partir da análise de 1000 eritrócitos do sangue periférico dos peixes, para verificar a incidência de anomalias nucleares. Esse parâmetro foi utilizado para avaliar a citotoxicidade das águas lago em relação às espécies de peixes estudadas. Dentre as espécies analisadas a Tilápia do Nilo apresentou a maior média de células binucleadas ( $0,792 \pm 1,382$ ) e células com núcleos alterados. Dentre as anomalias nucleares desta espécie, a maior média foi de células com núcleo “notched” ( $13,000 \pm 7,616$ ).

Através da determinação da frequência total de alterações nucleares (figura 20) de cada espécie foi aplicado o teste estatístico Mann Whitney – *U* considerando o nível de significância de 5% (anexo 4). O teste relaciona todas as espécies comparando-as em relação as suas médias totais de anormalidades nucleares registradas. A espécie *Oreochromis niloticus* quando relacionada com as outras espécies, foi a que apresentou a maior frequência total de alterações nucleares significativas ( $P < 0,05$ ). A espécie *Astyanax binaculatus*

*lacustres* foi a que apresentou a menor frequência de alterações nucleares, quando comparada entre as demais espécies ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Médias e desvios padrões das anormalidades nucleares registradas em 1000 células de eritrócitos do sangue periférico das espécies de peixes estudadas do Lago Paranoá (Mann Whitney –  $U$ ,  $P < 0,05$ ).

	Acará	Tucunaré	Traíra	Lambari	Tilapia	Carpa	Sagüiru
Células Binucleadas	0,167± 0,637	0,348± 0,832	0,650± 1,268	0,208± 0,658	<b>0,792±</b> <b>1,382</b>	0,353± 0,786	0,125± 0,338
Células com núcleo “blebbed”	2,792± 2,519	5,217± 3,717	5,300± 3,541	0,917± 1,248	<b>10,500±</b> <b>8,097</b>	1,412± 1,770	1,292± 1,967
Células com núcleo “lobed”	1,583± 1,909	1,000± 1,128	1,350± 1,785	0,417± 0,584	<b>10,000±</b> <b>8,033</b>	1,706± 3,312	0,417± 0,929
Células com núcleo “notched”	1,333± 2,036	2,609± 2,291	4,900± 5,190	0,375± 0,647	<b>13,000±</b> <b>7,616</b>	2,059± 1,784	1,458± 1,474



**Figura 20.** Gráfico da distribuição das anomalias nucleares nas espécies estudadas do Lago Paranoá, DF, 2006.

### 5.1.2. Teste do Cometa.

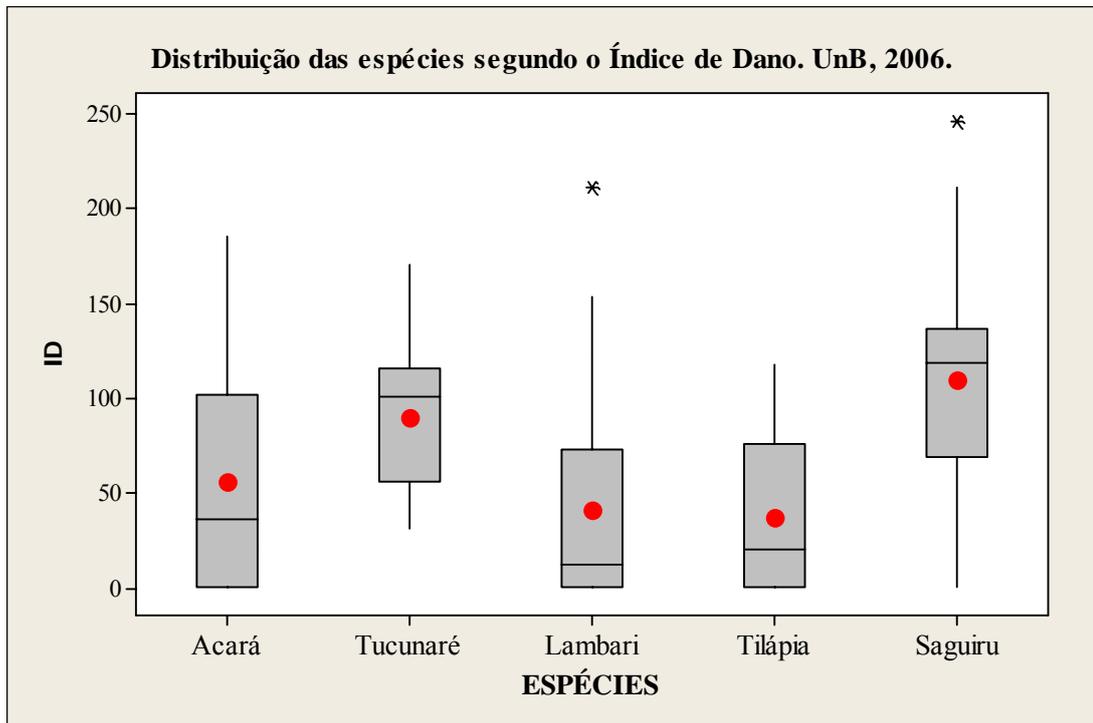
Os resultados referentes ao teste do cometa foram obtidos por meio do estudo de cinco espécies provenientes do Lago Paranoá: *Geophagus brasiliensis*, *Cichla temensis*, *Astyamax binaculatus lacustres*, *Oreochromis niloticus* e *Steindacnerina inculpita*. As outras duas espécies foram eliminadas das análises (*Hoplias malabaricus* e *Cyprinus carpio*) devido ao pequeno tamanho da amostra. Os resultados dessas análises estão demonstrados nas tabelas do anexo 2, onde os nucleóides foram classificados do nível 0 ao 4. Na tabela 2, estão representadas as médias e desvios padrões dos índices de danos encontrados pela análise dos eritrócitos do sangue periférico de cada espécie de peixe estudada.

**Tabela 2.** Representação do número total de indivíduos analisados, das médias e desvios padrões dos índices de danos calculados nos eritrócitos das cinco espécies estudadas do Lago Paranoá.

<b>Espécie</b>	<b>Nº de indivíduos</b>	<b>Média ± D.P. do ID</b>
<i>Geophagus brasiliensis</i>	15	55,53 ± 62,01
<i>Cichla temensis</i>	16	89,44 ± 39,52
<i>A. binaculatus lacustres</i>	25	40,76 ± 61,24
<i>Oreochromis niloticus</i>	22	37,32 ± 43,63
<i>Steindacnerina inculpita</i>	18	109,11 ± 64,33

Legenda: ID = Índice de danos

Através das médias dos índices de danos, realizou-se a ANOVA pelo programa de estatística básica MINITAB. Os resultados demonstraram que a espécie que apresentou a maior média do índice de danos foi a *Steindacnerina inculpita* (saguiru), com um valor de  $109,11 \pm 64,33$ ; estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ). Enquanto a espécie que apresentou o menor ID foi a Tilapia do Nilo, com uma média de ID de  $37,32 \pm 43,63$ ; estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ). Na figura 21 podemos visualizar a distribuição das espécies do Lago Paranoá segundo o índice de danos encontrados pelo ensaio do cometa.

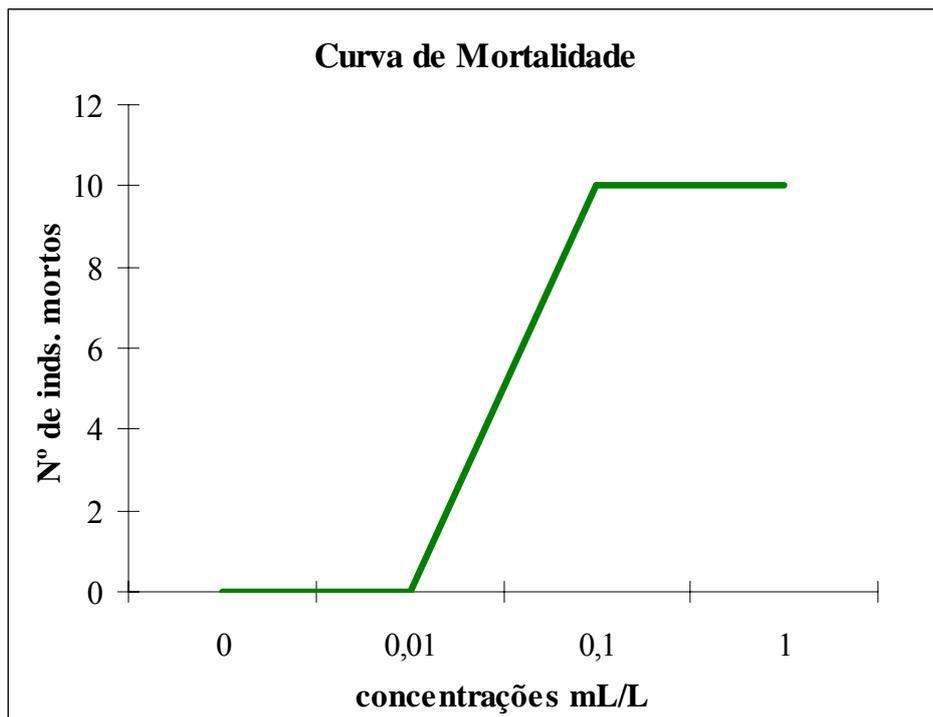


**Figura 21.** Gráfico representando a média, desvio padrão e mediana (em vermelho) dos IDs das espécies do Lago Paranoá. OBS: o asterisco são dados “outlier”.

## 5.2. Genotoxicidade e alterações gonadais causadas pelo nonilfenol

### 5.2.1. CL 50 do nonilfenol na espécie *O. niloticus*

A avaliação da toxicidade do nonilfenol em *O. niloticus*, por meio do teste de CL50%, apresentou um valor de 0,032  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (figura 22).



**Figura 22.** Curva de mortalidade de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* tratadas com nonilfenol. CL 50 = 0.032 mL/L (Trimmed Spearman-Kärber).

### 5.2.2. Teste de Micronúcleo e Anomalias Nucleares

Os resultados da avaliação genotóxica do nonilfenol através do teste do micronúcleo estão reunidos na tabela 3. As médias foram calculadas e aplicadas no teste estatístico não-paramétrico de Mann Whitney – *U*, levando em consideração o nível de significância de 5%. Os tratamentos aplicados (1, 10 e 16  $\mu$ L/L) não mostraram diferenças relevantes em relação a frequência de micronúcleos do controle negativo (anexo 5).

**Tabela 3.** Número total de indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* utilizados nos tratamentos com nonilfenol, médias e desvios padrões de micronúcleos encontrados nos peixes estudados.

<b>Tratamentos</b>	<b>Nº de indivíduos</b>	<b>Médias e D.P. de MN</b>
<b>Controle</b>	10	0,500 ± 0,707
<b>1µL/L de NP</b>	10	0,600 ± 0,966
<b>10µL/L de NP</b>	10	0,700 ± 0,675
<b>16µL/L de NP</b>	10	0,400 ± 0,699

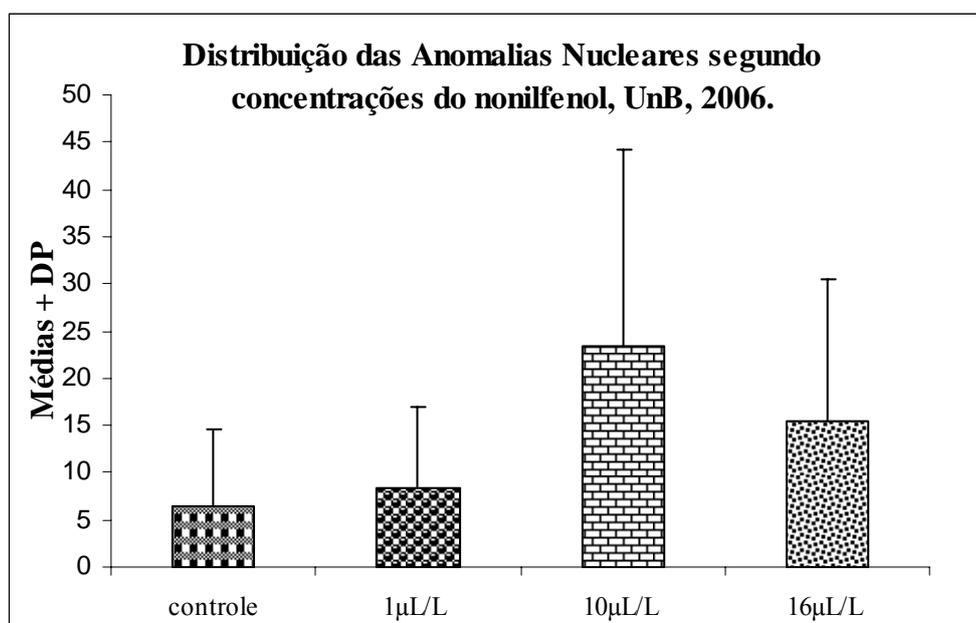
A avaliação da citotoxicidade do nonilfenol nos peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foi realizada através da contagem de anomalias nucleares em 1000 eritrócitos do sangue periférico. Dentre os três tratamentos aplicados (1, 10 e 16µL/L), a concentração de 10 µL/L foi a que apresentou a maior freqüência de células com alterações nucleares. Dentre as anomalias nucleares encontradas nesta concentração a maior média foi de células com núcleo “notched” (13,100 ± 12,133) (tabela 4).

Para a realização do teste estatístico, os tipos de alterações nucleares foram somados e as células foram classificadas como possuindo alterações nucleares ou não. A partir desta nova classificação os dados foram aplicados no teste de Mann Whitney - *U*, levando em consideração o nível de significância de 5% (anexo 6).

De acordo com os resultados das análises estatísticas podemos observar que em relação ao controle, os tratamentos de 10 e 16µL/L de NP apresentaram diferenças significantes de alterações nucleares em relação ao controle. Embora, tenha sido evidenciado que a concentração de 1µL/L de NP difere estatisticamente da concentração de 10µL/L ( $P < 0,05$ ) (figura 23).

**Tabela 4.** Representação do número de indivíduos, média e desvios padrões das anormalidades nucleares encontradas nos tratamentos com nonilfenol.

Tratamentos	Controle	1 $\mu\text{L/L}$ de NP	10 $\mu\text{L/L}$ de NP	16 $\mu\text{L/L}$ de NP
<b>Células Binucleadas</b>	0,100 $\pm$ 0,316	0	<b>0,100 <math>\pm</math> 0,316</b>	0
<b>Células com núcleo “blebbed”</b>	1,000 $\pm$ 1,414	1,900 $\pm$ 2,558	<b>5,300 <math>\pm</math> 4,691</b>	2,600 $\pm$ 2,674
<b>Células com núcleo “lobed”</b>	1,700 $\pm$ 2,626	2,100 $\pm$ 2,601	<b>4,800 <math>\pm</math> 5,287</b>	3,000 $\pm$ 4,136
<b>Células com núcleo “notched”</b>	3,600 $\pm$ 4,325	4,300 $\pm$ 4,372	<b>13,100 <math>\pm</math> 12,133</b>	9,900 $\pm$ 9,746



**Figura 23.** Gráfico representando a distribuição das médias e desvios padrões das anomalias nucleares segundo os diferentes tratamentos com nonilfenol.

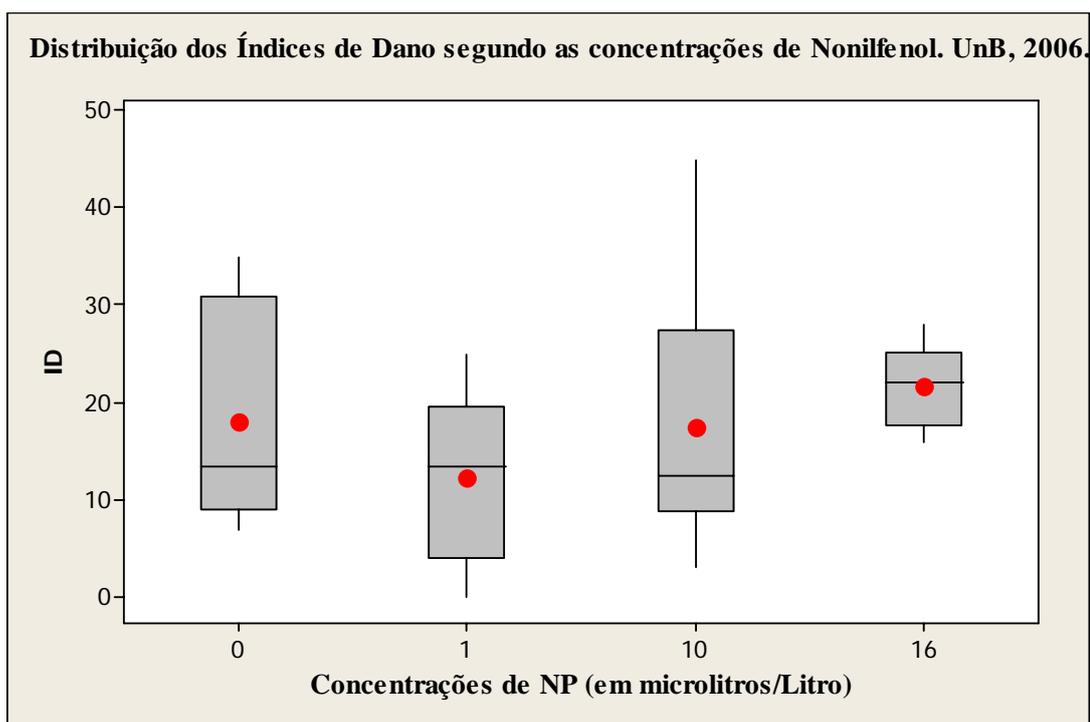
### 5.2.3. Teste do Cometa

A avaliação do potencial genotóxico do nonilfenol através do ensaio do cometa está representada na tabela 5. As médias e os desvios padrões do índice de danos dos tratamentos (1, 10 e 16 $\mu\text{L/L}$ ) foram analisados estatisticamente através do programa MINITAB, onde foi

realizado o teste ANOVA, demonstrando que não houve diferenças significativas entre as médias dos IDs em comparação com o controle negativo (figura 24).

**Tabela 5.** Representação do número de indivíduos, média e desvio padrão dos índices de danos dos tratamentos com o nonilfenol.

Tratamentos	Nº de indivíduos	Médias e D.P. do I.D.
Controle	10	18,000 ± 10,801
1 µL/L de NP	10	12,300 ± 8,994
10 µL/L de NP	10	17,500 ± 12,756
16 µL/L	10	21,700 ± 4,084



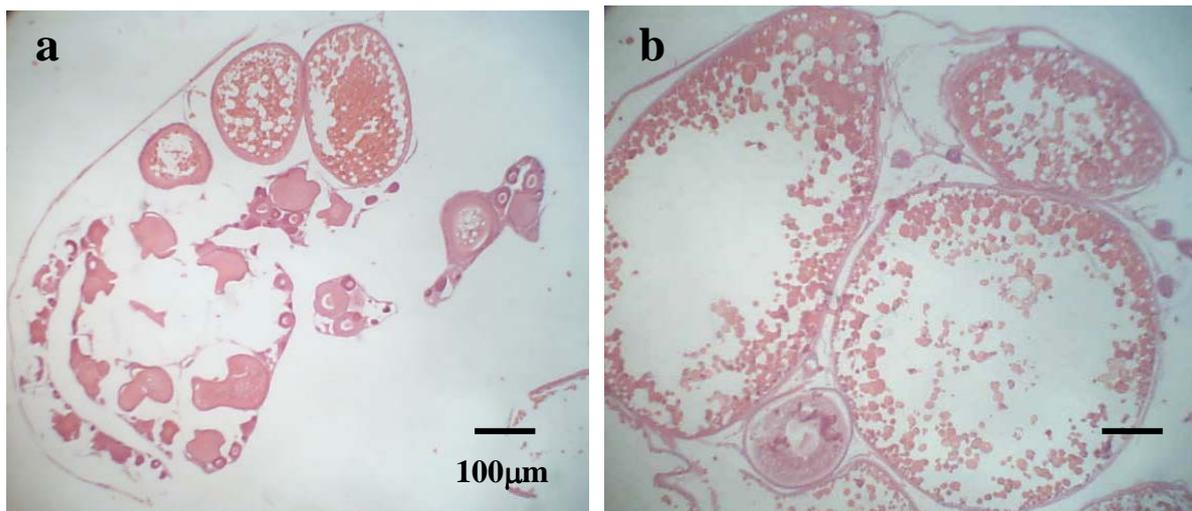
**Figura 24.** Gráfico da distribuição das médias, desvios padrões e mediana (em vermelho) dos índices de danos segundo as concentrações de nonilfenol.

#### 5.2.4. Alterações gonadais causadas pelo nonilfenol

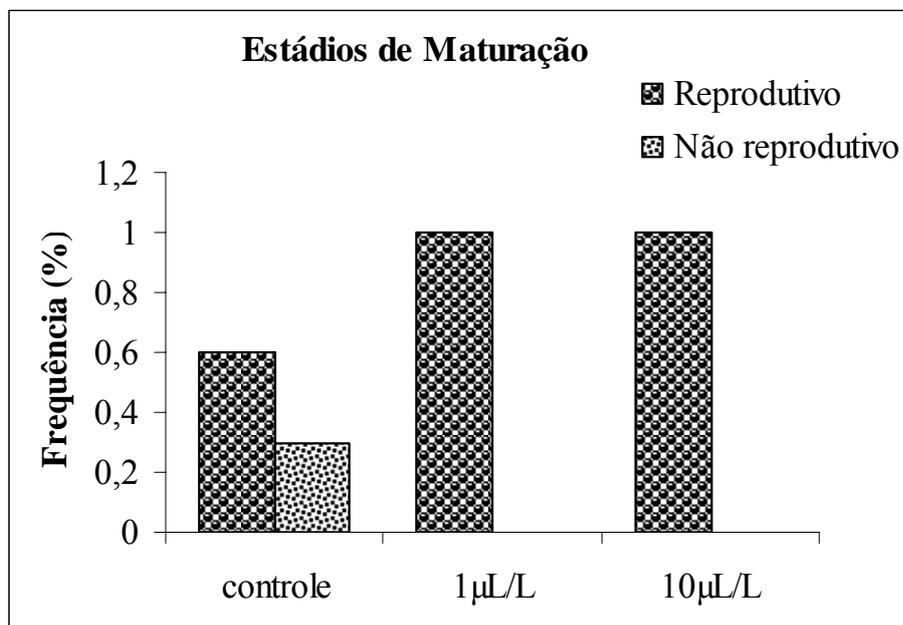
Dentre os tratamentos com nonilfenol etoxilado em *O. niloticus*, nas concentrações de 1, 10 e 16 $\mu$ L/L, a concentração de 16 $\mu$ L/L causou alterações gonadais estatisticamente significantes, como aumento da vitelogênese e espermatogênese (Figura 25).

A análise dos estádios de maturação das concentrações 1 e 10  $\mu$ L/L demonstraram que os indivíduos estavam todos no período reprodutivo em relação ao controle (Figura 26). Na concentração de 16  $\mu$ L/L de NP, tanto no controle quanto no tratamento, todos os indivíduos se apresentaram em estágio reprodutivo (Figura 27).

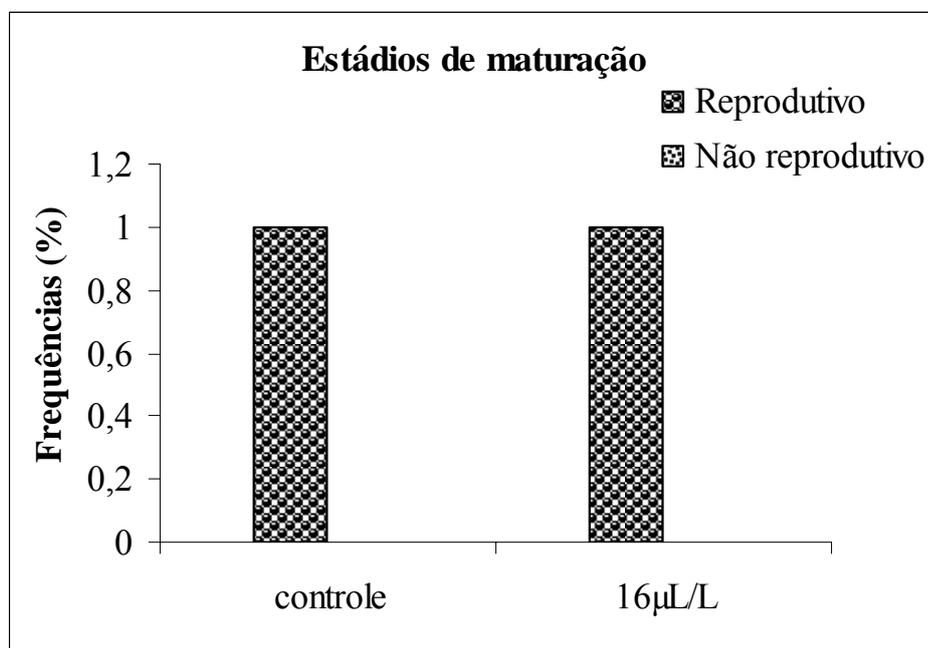
A análise morfométrica foi realizada em ovócitos classificados no estágio cinco de maturação. As médias dos diâmetros (em  $\mu$ m) das concentrações de 1 e 10  $\mu$ L/L de NP não foram estatisticamente significantes em relação ao controle (Anexo 7). Determinando que nestes tratamentos o nonilfenol não estimula a vitelogênese nesta espécie. As médias da concentração de 16  $\mu$ L/L do NP foram estatisticamente significantes em relação aos diâmetros dos controles, evidenciando a ação do NP no aumento da vitelogênese neste tratamento (Anexo 7).



**Figura 25.** Fotos de microscopia, em aumento de 40x, de ovócitos no estágio cinco de maturação, onde podemos observar o aumento da vitelogênese nos indivíduos expostos a concentração de 16  $\mu$ L/L de nonilfenol etoxilado (b) em relação ao controle (a)



**Figura 26.** Gráfico representando a frequência dos estádios de maturação das gônadas analisadas da espécie *O. niloticus* em duas concentrações diferentes de NP (1 e 10 µL/L).



**Figura 27.** Gráfico representando a frequência dos estádios de maturação das gônadas analisadas da espécie *O. niloticus* na concentração de 16 µL/L de NP.

### **5.3. Avaliação de efeitos causados pelo efluente final das estações de tratamento de esgoto em gônadas de *O.niloticus*.**

De acordo com os resultados das análises de água da CAESB, realizadas mensalmente, não existem diferenças nos padrões físicos - químicos entre os locais de coleta (tabela 6 e 7).

O resultado das análises dos estádios de maturação dos indivíduos da espécie *O. niloticus* expostos ao efluente final bruto da ETE norte por 72 h, demonstraram que 50% dos peixes, no controle, estavam em período reprodutivo e 50% em período não reprodutivo. Enquanto, 70% dos indivíduos expostos ao tratamento foram estimulados e estavam no período reprodutivo em relação ao controle (figura 28).

Os dados analisados da exposição dos peixes desta espécie ao efluente bruto da ETE sul, evidenciaram que 60% dos indivíduos do controle foram classificados como não reprodutivos, enquanto 50% dos espécimes expostos ao tratamento foram classificados como em período reprodutivo (Figura 29). Não foram encontrados ovócitos em estágio cinco nos peixes submetidos à exposição aos efluentes, o qual foi padronizado como parâmetro de estimulação gonadal em nosso estudo.

**Tabela 6.** Desempenho Operacional da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Norte. Período: Julho de 2005 à julho de 2006.

Período	Volumes (m³/mês)	Vazão Real/Proj (%)	DBO			DQO			TKN			PT			SS		
			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)		
			Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente
Jul-05	1.456.903	59%	384,0	1,0	99,7%	652,0	33,0	94,9%	80,3	6,0	92,5%	8,0	0,3	96,9%	247,0	6,0	97,6%
Ago-05	1.298.123	58%	338,0	10,0	97,0%	682,0	36,0	94,7%	50,9	14,2	72,1%	7,5	0,2	96,8%	209,0	6,0	97,1%
Set-05	1.384.508	56%	356,0	3,0	99,2%	715,0	34,0	95,2%	51,0	10,7	79,0%	7,7	0,2	97,3%	331,0	5,0	98,5%
Out-05	1.398.619	59%	340,0	3,0	99,1%	830,0	34,0	95,9%	54,5	10,2	81,3%	7,6	0,5	92,9%	461,0	6,0	98,7%
Nov-05	1.305.160	53%	NA	NA		576,0	37,0	93,6%	45,3	9,7	78,6%	6,4	0,3	95,6%	214,0	8,0	96,3%
Dez-05	1.427.063	60%	NA	NA		581,0	34,0	94,1%	38,7	10,9	71,8%	4,9	0,3	94,3%	138,0	5,0	96,4%
Jan-06	1.269.913	52%	361,0	8,0	97,8%	662,0	34,0	94,9%	41,9	5,1	87,8%	6,0	0,4	93,3%	236,0	7,0	97,0%
Fev-06	1.303.514	53%	301,0	2,0	99,3%	538,0	32,0	94,1%	42,2	6,7	84,1%	5,8	0,4	93,1%	216,0	7,0	96,8%
mar-06	1.577.952	66%	405,0	5,0	98,8%	726,0	31,0	95,7%	41,5	5,5	86,7%	6,8	0,6	91,2%	283,0	7,0	97,5%
Abr-06	1.441.076	58%	NA	NA		549,0	39,0	92,9%	43,9	9,9	77,4%	6,0	0,4	93,3%	174,0	11,0	93,7%
mai-06	1.435.333	60%	286,0	17,0	94,1%	521,0	46,0	91,2%	41,8	9,6	77,0%	6,6	1,6	75,8%	182,0	14,0	92,3%
Jun-06	1.264.699	53%	357,0	7,0	98,0%	595,0	42,0	92,9%	45,7	9,8	78,6%	6,6	0,7	89,4%	186,0	10,0	94,6%
Jul-06	1.180.941	48%	347,0	6,0	98,3%	677,0	47,0	93,1%	47,7	5,3	88,9%	6,6	0,3	94,7%	202,0	11,0	94,6%
<b>Média</b>	<b>1.364.908</b>	<b>57%</b>	<b>347,5</b>	<b>6,2</b>	<b>98,1%</b>	<b>638,8</b>	<b>36,8</b>	<b>94,1%</b>	<b>48,1</b>	<b>8,7</b>	<b>81,2%</b>	<b>6,7</b>	<b>0,5</b>	<b>92,7%</b>	<b>236,8</b>	<b>7,9</b>	<b>96,2%</b>

Vazão de projeto (L/s): 920  
População de saturação: 250.000

PT: Fósforo total  
SS: Sólidos em suspensão

Legenda:

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio

DQO: Demanda química de oxigênio

TKN: Nitrogênio total kjeldah

Tratamento

Remoção Biológica de Nutrientes + Polimento Final

Fonte: POEP/POE/DP

**Tabela 7.** Desempenho Operacional da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Sul. Período: Julho de 2005 à julho de 2006.

Período	Volumes		Vazão Real/Proj (%)	DBO			DQO			TKN			PT			SS			
	(m³/mês)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)			Concentração (mg/l)		Rem. (%)	
	Afluente	Efluente		Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Efluente	Afluente	Efluente	Primário	Efluente
jul-05	2.333.758	2.333.758	58%	272,0	6,0	97,8%	454,0	41,0	91,0%	32,5	12,3	62,2%	6,9	0,2	96,5%	181,0	6,0	50,8%	96,7%
ago-05	2.494.598	2.494.598	69%	309,0	4,0	98,7%	479,0	40,0	91,6%	35,2	15,4	56,3%	7,3	0,3	96,3%	192,0	9,0	42,7%	95,3%
set-05	2.614.417	2.614.417	65%	327,0	6,0	98,2%	592,0	39,0	93,4%	45,0	15,2	66,2%	6,7	0,3	95,2%	249,0	8,0	60,2%	96,8%
out-05	2.744.546	2.744.546	71%	339,0	4,0	98,8%	557,0	44,0	92,1%	48,9	16,9	65,4%	6,4	0,4	93,3%	278,0	10,0	71,9%	96,4%
nov-05	2.821.867	2.821.867	70%	258,0	6,0	97,7%	615,0	46,0	92,5%	44,4	10,9	75,5%	8,6	0,4	94,8%	267,0	9,0	65,5%	96,6%
dez-05	3.394.562	3.394.562	87%	230,0	14,0	93,9%	464,0	35,0	92,5%	39,4	12,1	69,3%	7,2	0,3	95,8%	250,0	7,5	64,4%	97,0%
jan-06	2.867.245	2.867.245	71%	221,0	11,0	95,0%	554,0	42,0	92,4%	39,9	9,8	75,4%	5,9	0,3	94,4%	257,0	7,0	71,6%	97,3%
fev-06	2.904.394	2.904.394	72%		7,0		365,0	44,0	87,9%	37,8	11,5	69,6%	5,2	0,3	94,2%	226,3	12,0	63,8%	94,7%
mar-06	3.416.044	3.416.044	88%	239,0	8,0	96,7%	431,0	39,0	91,0%	35,1	9,6	72,8%	4,8	0,2	95,8%	193,0	8,0	53,4%	95,9%
abr-06	3.000.820	3.000.820	75%	248,0	7,5	97,0%	472,0	40,0	91,5%	71,0	11,3	84,2%	5,0	0,3	94,8%	226,0	11,0	58,4%	95,1%
mai-06	2.826.551	2.826.551	73%	236,7	10,0	95,8%	612,9	44,4	92,8%	40,5	13,3	67,2%	5,7	0,3	95,3%	228,4	9,2	58,0%	96,0%
jun-06	2.392.650	2.392.650	62%	312,8	12,0	96,2%	582,6	43,4	92,6%	46,7	16,8	63,9%	6,1	0,3	95,4%	222,7	8,6	58,6%	96,1%
jul-06	2.417.681	2.417.681	60%	331,0	16,0	95,2%	470,0	44,0	90,6%	45,9	16,7	63,6%	6,6	0,3	96,2%	184,0	7,7	48,9%	95,8%
<b>Média</b>	<b>2.786.856</b>	<b>2.786.856</b>	<b>71%</b>	<b>277,0</b>	<b>8,6</b>	<b>96,7%</b>	<b>511,4</b>	<b>41,7</b>	<b>91,7%</b>	<b>43,3</b>	<b>13,2</b>	<b>68,6%</b>	<b>6,3</b>	<b>0,3</b>	<b>95,2%</b>	<b>227,3</b>	<b>8,7</b>	<b>59,1%</b>	<b>96,1%</b>

Vazão de projeto (L/s): 1.500  
População de saturação: 460.000

PT: Fósforo total  
SS: Sólidos em suspensão

Legenda:

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio

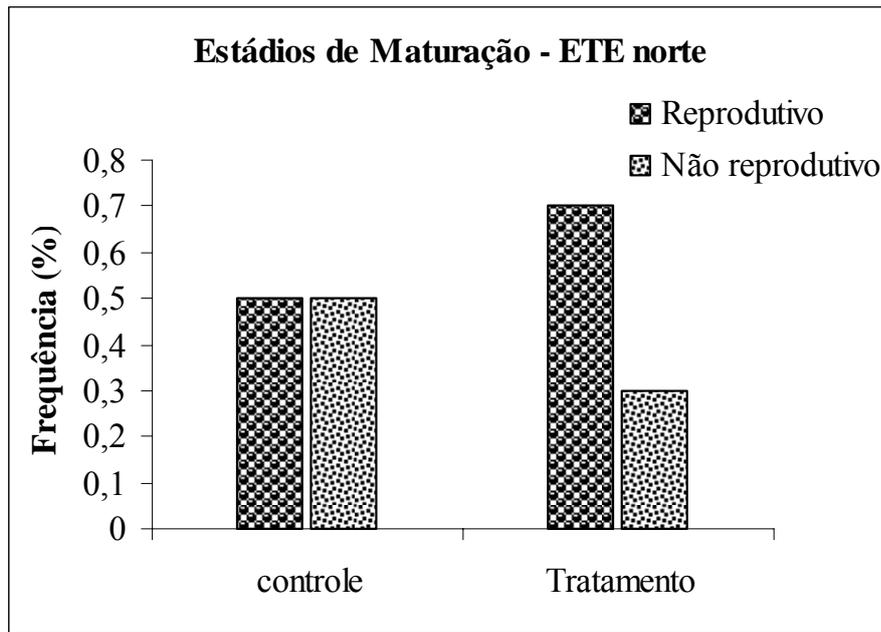
DQO: Demanda química de oxigênio

TKN: Nitrogênio total kjeldah

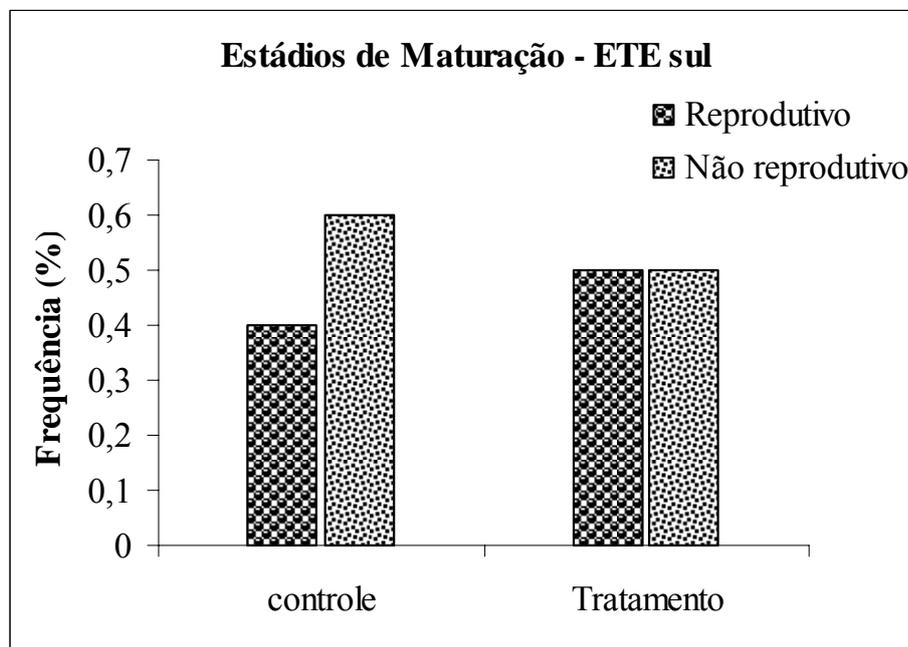
Tratamento

Remoção Biológica de Nutrientes + Polimento Final

Fonte: POEP/POE/DP



**Figura 28.** Gráfico representando a classificação dos estádios de maturação, em reprodutivos e não reprodutivos, de peixes da espécie *O. niloticus* expostos ao efluente final da ETE norte.



**Figura 29.** Gráfico representando a classificação dos estádios de maturação, em reprodutivos e não reprodutivos, de peixes da espécie *O. niloticus* expostos ao efluente final da ETE sul.

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1. Avaliação físico – química das águas do lago.**

A qualidade das águas do Lago Paranoá é monitorada pela CAESB através de análises físico – químicas realizadas através de coletas periódicas em diferentes pontos. Além disso, monitora periodicamente também os efluentes das ETEs. Os níveis de compostos orgânicos diminuem consideravelmente do afluente para o efluente, demonstrando eficiência no tratamento do esgoto. Por exemplo, no mês de maio de 2006 a concentração de sólidos em suspensão no afluente era de 182 mg/L enquanto que no efluente era de apenas 14 mg/L. A demanda bioquímica de oxigênio no afluente, no mesmo mês, foi de 286 mg/L, enquanto no efluente foi de 17 mg/L. Os valores de DBO, DQO, TKN, PT e SS foram monitorados durante o período do mês de julho do ano de 2005 até o mês de julho de 2006 e a média anual dos valores encontrados não difere significativamente dos valores encontrados em cada mês do monitoramento.

De acordo com os dados das análises físico-químicas dos efluentes finais das ETEs, existe uma depuração rigorosa do material orgânico contido nos afluentes para manter a qualidade das águas do Lago Paranoá, proporcionando um ecossistema com grande diversidade de peixes e outros organismos aquáticos, onde não existe mortalidade de peixes desde a década de 60 quando o lago se tornou hipertrófico.

### **6.2. O peixe como sistema teste.**

Os peixes foram escolhidos como sistema teste para a realização do monitoramento do Lago Paranoá, pois são considerados bons bioindicadores da presença de compostos genotóxicos contaminado ambientes aquáticos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Burgeot *et al.*, 1995; Bealpaeme *et al.*, 1996; Bombail *et al.*, 2001; Grisolia & Starling, 2001; Andrade *et al.*, 2004; Bolognese *et al.*, 2004); além disso, há grande número de estudos, ao quais nos

serviram como referência, demonstrando a eficácia desses organismos para estudos de biomonitoramento ambiental.

Levando em consideração a diversidade de peixes encontrados no lago, trabalhamos com sete espécies diferentes, ampliando os resultados do monitoramento quando realizado tanto em espécies exóticas como nativas. Em estudos anteriores já foram realizados experimentos com espécies exóticas do lago Paranoá (*O. niloticus*, *O. rendalli* e *Cyprinus carpio*) mostrando que são eficientes para detectar genotoxicidade no ambiente aquático (Grisolia & Cordeiro, 2000; Grisolia & Starling, 2001; Grisolia, 2002; Grisolia *et al.*, 2005; Souza & Fontanetti, 2006).

A espécie de peixe selecionada para a realização dos experimentos em laboratório foi a *O. niloticus*, amplamente utilizada como modelo para testes genotóxicos (Grisolia & Cordeiro, 2000; Palhares & Grisolia, 2002; Çavas & Gozukara, 2003; Grisolia *et al.*, 2005; Hoshina, 2005; Souza & Fontanetti, 2006). Os animais escolhidos para os testes, estavam com aproximadamente três meses de vida (7 a 10 cm de comprimento), isto é no início da fase fértil. Esses animais provenientes da Estação de Piscicultura do Governo do Distrito Federal foram então utilizados para verificar os efeitos do nonilfenol em animais adultos reprodutivamente.

### **6.3. Genotoxicidade do Lago Paranoá**

A avaliação da genotoxicidade das águas do lago foi realizada com a aplicação da técnica do micronúcleo, cometa e anomalias nucleares. Anteriormente o lago foi avaliado genotoxicamente apenas pelo teste de MN (Grisolia & Starling, 2001; Grisolia *et al.*, 2005), sendo inovadora a utilização do ensaio do cometa. Outros trabalhos consideram este teste mais específico e sensível que outros (Belpaeme *et al.*, 1996; Lee & Steinert, 2003; Ferraro *et al.*, 2004), aprimorando este estudo.

### **6.3.1. Teste do micronúcleo**

O teste do micronúcleo é muito utilizado para a realização de teste genotóxicos utilizando eritrócitos, células do fígado e células dos tecidos das brânquias de peixes (Manna e Sadhukhan, 1986; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Missini *et al.*, 1996; Ayllón & Garcia-Vazquez, 2001; Grisolia, 2002; Cavas & Ergene-Gozukara, 2003).

Os resultados do teste de MN mostraram que a espécie com maior frequência de MNs foi a *Cichla temensis* (Tucunaré) em relação as outras espécies do lago, seguido da *Hoplias malabaricus* (Traíra) e da *Astyamx binaculatus lacustres* (Lambari). Tais resultados podem estar associados aos hábitos alimentares das espécies, pois tanto o tucunaré como a traíra são carnívoros e estão no topo da cadeia alimentar, podendo ocorrer bioacumulação de substâncias genotóxicas nestes organismos. No Brasil, poucas espécies nativas de peixes são utilizadas em ensaios de toxicidade e de genotoxicidade, e na literatura não existem registros sobre o uso destas espécies para o biomonitoramento de ambientes aquáticos.

Kim & Hyun (2006), utilizaram o teste do micronúcleo para avaliar respostas genotóxicas em diversos tecidos de *Cyprinus carpio* e *Oncorhynchus mykiss* comparando os resultados com o teste do cometa.

### **6.3.2. Teste do Cometa.**

O ensaio do cometa tem sido proposto como uma excelente ferramenta da genotoxicologia. O teste evidencia danos na molécula do DNA pela migração diferencial do material nuclear quando aplicado em eletroforese (Belpaeme *et al.*, 1996; Mitchelmore & Chipman, 1998; Lee & Steinert, 2003; Ferraro *et al.*, 2004). Sua utilização para verificar a ação genotóxica das águas do lago nas espécies estudadas, revelou que a espécie com maior frequência de índice de danos no DNA foi a *Steindacnerina inculpita* (Sagüiru), seguida pela espécie *Cichla temensis* (Tucunaré) e da *Geophagus brasiliensis* (Acará). Por estes resultados

podemos inferir que estas espécies, em relação às outras, sofreram maiores danos no material genético. Estudos anteriores realizados no lago não avaliaram a genotoxicidade pelo teste do cometa, tornando-os novos parâmetros a serem utilizados como referência a experimentos futuros. Além disso, não existem relatos na literatura da utilização destas espécies no monitoramento do ambiente aquático, utilizando ambos testes simultaneamente. Comparando os dois testes, a *Cichla temensis* apresentou os maiores índices relativos de genotoxicidade e citotoxicidade.

### **6.3.3 Anormalidades nucleares.**

A maioria das alterações citogenéticas (células binucleadas, células com núcleos “blebbed”, “lobed” e “notched”) foi observada na espécie *O. niloticus*, seguido pela *Hoplias malabaricus* e *Cichla temensis*. Atualmente, a identificação de diferentes tipos de anomalias nucleares nos eritrócitos periféricos dos peixes, são também consideradas resultantes de agressões genotóxicas ou citotóxicas (Palhares & Grisolia, 2002; Ayllón & Garcia-Vazquez, 2001; Çavas & Ergene-Gozukara, 2003; Souza & Fontanetti, 2006). Neste trabalho as anomalias nucleares não estão relacionadas com os outros testes genotóxicos.

### **6.4. Ação do nonilfenol etoxilado na espécie *O. niloticus***

Para a avaliação de toxicidade, genotoxicidade e citotoxicidade do surfactante nonilfenol etoxilado utilizamos como modelo animal, a espécie *Oreochromis niloticus*, bastante utilizada como bioindicador de poluentes químicos em ambientes aquáticos por outros autores (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Grisolia & Cordeiro, 2000; Bombail *et al.*, 2001; Grisolia *et al.*, 2005; Souza & Fontanetti, 2006). Os peixes são susceptíveis aos pesticidas dissolvidos na água e podem ser expostos a vários químicos através das brânquias, pele e por contaminação dos alimentos (Bisson & Hontela, 2002). Além disso, o nonilfenol já

demonstrou seu potencial de bioacumulação dependente do tempo de exposição da espécie de peixe *Onchirynchus mykiss* (Uguz *et al.*, 2003).

As espécies *Oryzias latipes* (medaka) e *Poecilia reticulata* (guppy) já foram utilizadas como sistema teste para a avaliação de desreguladores endócrinos como  $\beta$ -HCH, TBT/DBT e Bromido. Todos estes compostos causam alterações na fisiologia do animal, algumas restritas para o sistema reprodutivo e outras alterações modificam até a produção de hormônios reprodutivos e da tireóide. Por exemplo, o aumento da vitelogênese, mudanças gonadais, ovotestis, alterações na retina, atrofia do timo, armazenamento de glicogênio e distúrbios na locomoção, dentre outros (Wester *et al.*, 2004).

A concentração letal (CL 50%) do NP foi determinada pela exposição por 72 h dos peixes à quatro diferentes concentrações (0; 0,01; 0,1 e 1 mL/L). Quando comparado com outros sistemas teste como: camundongo (CL 50% = 75,63 ml/Kg), *Drosophila melanogaster* (CL 50% = 0,043 mL/L) e *Biomphalaria tenagophila* (CL 50% = 12,56 mL/L ) (Oliveira-Filho *et al.*, 2005), a toxicidade do NP na *O niloticus* é maior (CL 50% = 0,032mL/L), mas não significativamente em relação aos resultados obtidos com a *Drosophila melanogaster* .

A análise genotóxica do nonilfenol em *O. niloticus* não revelaram diferenças estatisticamente relevantes entre as médias em relação ao controle negativo, tanto para a frequência de MNs como para o índice de danos no DNA avaliados pelo teste do cometa. Similarmente, o nonilfenol não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre as médias de MNs em camundongos tratados com uma concentração de 196,7 mg/Kg do poluente (Grisolia *et al.*, 2004). Na literatura, não há registro que sugira que o NP seja genotóxico em sistemas testes como células de bactérias ou de mamíferos (Grisolia *et al.*, 2004). Logo, o resultado do nosso trabalho está coerente com relação à genotoxicidade do NP, mostrando que em peixes o NP também não exerce ação genotóxica.

Na análise da citotoxicidade do NP, a concentração que apresentou a maior frequência total de anomalias nucleares foi a de 10 µL/L de NP. As doses de 10 e 16 µL/L do poluente foram significativas em relação ao controle negativo, mostrando o potencial citotóxico do NP em peixes da espécie *O. niloticus*. Na literatura não existem relatos sobre a citotoxicidade do NP.

### **6.5. Efeitos do nonilfenol em tecido gonadal de *O. niloticus***

Os estudos desenvolvidos em tecidos para detectar o potencial de ação de compostos, como os desreguladores endócrinos, para verificar a bioacumulação e mudanças histopatológicas, aplicam o protocolo de histologia. Muitos autores usam esta técnica como referência para a avaliação de organismos aquáticos (Uguz *et al.*, 2003; Wester *et al.*, 2004).

Os animais foram classificados em reprodutivos e não reprodutivos de acordo com a análise dos estádios de maturação. Os animais utilizados para a realização do experimento estavam todos no período reprodutivo, tanto os controles quanto os tratados. Esta classificação, neste trabalho, não gerou resultados significativos, desta maneira foi determinante a análise morfométrica das células das gônadas para verificar se houve modificações no tecido gonadal devido à exposição ao nonilfenol.

Os dados obtidos da análise morfométrica dos ovócitos tipo V de peixes da espécie *O. niloticus*, expostos a três concentrações diferentes de NP, mostraram que a concentração de 16µL/L foi a que causou maior alteração na vitelogênese, estatisticamente significativa, de acordo com seu controle. As outras concentrações não foram estatisticamente significantes em relação ao seu controle ( $P>0,05$ ). Quando o estímulo gonadal causado pelo NP foi comparado entre as concentrações de 1 e 10 µL/L, apareceu uma diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros dos ovócitos analisados. Esta diferença entre as médias dos diâmetros pode ser uma casualidade, pois os animais eram do mesmo lote, mesma idade, todas as preparações

das diluições seguiram os mesmos procedimentos, uniformizando a quantidade de água nos aquários, monitoramento da temperatura, determinando uma padronização do experimento. Mesmo estas diferenças não sendo significativas é importante relatar a tendência do maior estímulo gonadal na concentração de 1 µL/L de NP.

#### **6.6. Efeitos gonadais causados pelo efluente final das ETEs Norte e Sul em peixes da espécie *O. niloticus*.**

Em relação aos resultados obtidos através do experimento com os efluentes das ETE Norte e Sul, não foram realizados a análise morfométrica, pois os peixes da espécie *O. niloticus* neste tratamento não apresentaram ovócitos tipo V. Desta forma, não alcançamos a padronização necessária para relacionarmos os resultados da morfometria do NP (controle positivo) com os dados obtidos do experimento com os efluentes das estações de tratamento de esgoto. Os animais foram classificados apenas pela análise dos estádios de maturação das gônadas, que demonstraram que tanto os animais do controle como do tratamento estavam em período reprodutivo. Nas condições desse estudo, a exposição aos efluentes das estações de tratamento de esgoto não influenciaram significativamente no estímulo das gônadas desta espécie. Com relação a esses resultados cabem duas possíveis indagações: 1. existem ou não substâncias químicas nas águas dos efluentes das ETEs com as propriedades de induzir alterações ou algum tipo de estímulo nas gônadas dos peixes? ou 2. o período de exposição de 72 h talvez tenha sido muito curto para evidenciar tais modificações ou estímulos, uma vez que se desconhece a real presença de tais substâncias, bem como se existirem, em quais concentrações estariam presentes? Assim, uma proposta de estudos futuros, ou continuidade desse estudo seria de realizar outros experimentos com diferentes tempos de exposição, acima de 72 h.

## **7. CONCLUSÕES**

- Dentre as espécies estudadas, a *Cichla temensis*, apresentou os maiores índices de danos no material genético.
- O nonilfenol é um composto citotóxico para a espécie *O. niloticus*.
- O nonilfenol não é um agente genotóxico para a espécie *O. niloticus*.
- Na concentração de 16 $\mu$ L/L o nonilfenol aumenta a vitelogênese em ovócitos de peixes da espécie *O. niloticus*.
- Os efluentes finais das estações de tratamento de esgoto da Asa Norte e Sul, da cidade de Brasília não causaram alterações gonadais na espécie *O. niloticus*, nas condições do nosso estudo.

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; KNEZ, S.; STEGNAR, P.; Chromium-induced Micronuclei in fish. **Journal of applied Toxicology**, vol. 14 n°5: pp 333-336. 1994.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, vol. 343: 121-135. 1995.
- ANDRADE, V.M.; FREITAS, T.R.O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, 560: 57-67. 2004.
- ARKHIPCHUK, V.V.; GARANKO, N.N.; Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 62: 42-52. 2005.
- ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; ALI, N.M.; AHMAD, W.; Induction of micronuclei & erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation research**, vol 518: 135-144. 2002.
- AYLLÓN, E. & GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 49: 221-225. 2001.
- BELPAEME, K. DELBEKE, K; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, vol. 11 n° 5 pp: 485-492. 1996.
- BISSON, M. & HONTELA, A.; Cytotoxic and Endocrine-Disrupting Potential of Atrazine, Diazinon, Endosulfan, and Mancozeb in Adrenocortical Steroidogenic Cells of Rainbow Trout Exposed *in vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 180: 110-117. 2002.
- BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHI, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDE, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; Comet and micronucleus

assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of total Environment**, vol. 333: 127-136. 2004.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGIERI, P.; FABBRI, R.; VIARENGO, A.; Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in Mussels: Experimental studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, vol. 33: 287-292. 1999.

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

BUCHINI, A.; MARTINO, A.; GUSTAVINO, B.; MONFRINOTTI, M.; POLI, P.; ROSSI, C.; SANTORO, M.; DORR, A.J.M.; RIZZONI, M.; Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimes exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutation research**, vol. 557: 119-129. 2004.

BURGEOT. T.; HIS. E.; GALGANI. F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutat. Research**, 342, 125-140. 1995.

CALDAS, E. D.; COELHO, R.; SOUZA, L. C. K. R.; SIBA, S. C. ; Organochlorine pesticides in Water, Sediment, and Fish of Paranoá Lake of Brasilia, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 62:199-206.1999.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, 438: 155-161. 1999.

- ÇAVAS, T. & ERGENE-GOZUKARA, S.; Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, 538: 81-91. 2003.
- DEVENTER, K., Detection of Genotoxic Effects on Cells of Liver and Gills of *B. rerio* by Means of Single Cell Gel Electrophoresis. **Environ. Contam. Toxicol.**, 56: 911-918. 1996.
- EPA - United States Environmental Protection Agency <http://www.epa.gov/ged/resrep95.ht>. (acesso 18/07/2006).
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam v. 455: 81-95. 2000.
- FERNANDEZ, M.; L'HARIDON, J.; GAUTIER, L.; SOY-MOREUX, C. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Inicial assessment. **Mutation Research**, 292:83-99. 1993.
- FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, C.O.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Mutation Research**, 27: 103-107. 2004.
- GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, 518: 145-150. 2002.
- GRISOLIA, C. K.; **Agrotóxicos - Mutações, Câncer & Reprodução**. Editora UnB, pp 392. 2005.

- GRISOLIA, K. C.; BILICH, M.R.; FORMIGLI, L.M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonilfenol ethoxylate. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 59: 123-126. 2004.
- GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**. 23, 235-239. 2000.
- GRISOLIA, C. K. ; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. de N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and molecular Biology**, 28, 2, 334-338. 2005.
- GRISOLIA, C.K.; STARLING, F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research** 491: 39-44. 2001.
- GUSTAVINO, B. SCORNAJENGHI, K. A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicines. **Mutation Research**, 494: 151-159. 2001.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V.; Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity assays. **Environ. Sci. Technol**, 11:714-719. 1977.
- HARTL, M.G.J.; COUGHLAN, B.M.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F.N.A.M.; O'REILLY, S.J.; HEFFRON, J.J.A.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N.M. Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. **Marine Environment Research**, 57: 295-310. 2004.

- HAYASHI, M.; UEDA, T.; UEYNO, K.; WADA, K.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y.; Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, vol 399: 125-133. 1998.
- HOOFTMAN, R. N. & RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, 104: 147-152. 1982.
- HORVÁTHOVÁ, E; SLAMENOVÁ, D; HLINCIKOVÁ, L.; MANDAL, T.K.; GÁBELOVÁ, A.; COLLINS, A.R. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. **Mutation Research**, 409: 163- 171. 1998.
- HOSHINA, M. M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de efluentes de refinarias de petróleo, por meio dos sistemas testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/ SP. 2005.
- JAGER, C de; BORNMAN, M.S.; WANDRAG, S.; SHARP, V.W.; Lethal dose & reproductive parameters of p-nonylphenol in rats. **Archives of Andrology**, vol 46: 183-187. 2001.
- JALOSZYNSKI P., KUJAWSKI M., WASOWICZ M., SZULC R.; SZYFTER K.; Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. **Mutation Research** 439: 199–206.1999
- JONKERS NIELS, REMI W.P.M. LAANE, PIM DE VOOGT; Sources and fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in the Dutch coastal zone of the North Sea. **Marine Chemistry**, 96:115– 135. 2005.

- KASHIWADA, S.; ISHIKAWA, H.; MIYAMOTO, N.; OHNISHI, Y.; MAGARA, Y.; Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. **Water Research**, vol 36: 2161-2166. 2002.
- KIM, H.S.; SHIN, J-H.; KANG, I.H.; KIM, T.S.; KIM, I. Y.; SEOK, J-H.; PYO, M-Y.; HAN, S.Y.; Comparative estrogenic effects of nonilfenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. **Reproductive Toxicology**, vol 16: 259-268. 2002.
- KIM, IL-KONG e HYUN, CHANG-KEE; Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for geonotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64: 288-297. 2006.
- LEE, RICHARD F., STEINERT, SCOTT Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Volume 544, 1: 43-64.2003.
- LEINO, R. L.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G. T. Gonadal histology and Characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19: 85-98. 2005.
- LEMOS, C.T.; RODEL, P.M.; TERRA, N.R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 20, n° 6, pp 1320-1324. 2001.
- LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S.; Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 19: 197-201. 2005.
- LI, D; KIM, M.; OH, J-R.; PARK, J.; Distribution characteristics of nonilfenols in the artificial Lake Shihwa, and surrounding creeks in Korea. **Chemosphere**, 56: 783-790. 2004.

- MAJONE, F.; BELTRAME, C.; BRUNETTI, R. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. **Mutation Research**, 209: 131-134. 1988.
- MALINS, D.C. & OSTRANDER, G.K. Perspectives in aquatic toxicology. **Rev. Pharmacol. Toxicol.** 31: 371-399. 1991.
- MANN WHITNEY-U - Programa Estatístico [http://en.wikipedia.org/wikimann-whitney\\_u](http://en.wikipedia.org/wikimann-whitney_u) .  
Acesso: 05/11/2006.
- MANNA, G. K. & SADHUKHAN, A. Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT.) **Current Science**, v. 55 n°10. 1986.
- MATSUMOTO, F.E. & CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, 23, 2, 489-492. 2000.
- MERSCH, J.; BEAUVAIS, M-N; NAGEL, P. Induction of micronucleus in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**, 371: 47-55. 1996.
- MERSCH, J.; BEAUVAIS, M-N. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. **Mutation Research**, 393: 141-149. 1997.
- MINITAB – Programa Estatístico <http://www.minitabbrasil.com.br>. Acesso: 05/11/2006.
- MIRACLE, A. L.; ANKLEY, G.T.; Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. **Reproductive Toxicology**, vol 19:321-326. 2005.
- MISSINI, S.; CICCOTI, 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. **Mutation research**, vol. 367: 245-251. 1996.

- MISSINI, S. & LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, 393: 17-21. 1997.
- MITCHELMORE C. L. & CHIPMAN J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Volume 399,2, 20:135-147.1998.
- MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**. Vol 96: 3-00. 2005.
- MONTEITH, D. K. AND VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Volume 345, 3-4: 97-103. 1995
- MOREIRA, R. C. A. & BOAVENTURA, G.R. Referência geoquímica regional para a interpretação das concentrações de elementos químicos nos sedimentos da bacia do Lago Paranoá – DF. **Quim. Nova**, Vol. 26, 6, 812-820, 2003.
- NACCI, D.; CAYULA, S.; JACKIM, E.; Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, vol. 35: 197-210. 1996.
- NAGAO, T.; WADA, K.; MARUMO, H.; YOSHIMURA, S.; ONO, H.; Reproductive effects of nonilfenol in rats after gavage administration: a two-generation study. **Reproductive Toxicology**, Vol. 15:293-315. 2001.
- NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANÓ, M.A.; CENTENO, A.C. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 30: 293-297. 1997.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C.; GERALDINO, B.R.; GRISOLIA, C.K.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life

- stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (orbigny, 1835). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 75: 1185-1190. 2005.
- OSTLING, O. & JOHANSON, K.J.; Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 123, nº 1, pp: 291-298. 1984.
- PALHARES, D & GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of Kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, 25, 3, 281-284. 2002.
- PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environment and Molecular Mutagenesis**, 26: 345-346. 1995.
- PIMENTEL, D.; HOUSER, J.; PREISS, E.; WHITE, O.; FANG, H.; MESNICK, L.; BARSKY, T.; TARICHE, S.; SCHRECK, J.; ALPERT, S.; Water Resources: Agriculture, the Environment, and Society. **BioScience**, vol 47 nº 2. 1997
- PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, vol. 97(3): 287-292. 2005.
- POSTEL, S. L.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R.; Human appropriation of renewable fresh water. **Science**, 271: 785- 787. 1996.
- POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science**, vol. 246, nº 4928, pp: 352-358. 1989.
- RABELLO-GAY, M. N. **Teste de micronúcleo em medula óssea. In: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.** Sociedade Brasileira de Genética (ed) pp 83- 90. 1991.
- RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; STINGO, V.; Assessment of environmental stress by the micronucleus test and comet assay on the genome of teleost

- populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 57: 168-174. 2004.
- SAKAI, A.; p-Nonilfenol acts as a promoter in the BALB/3T3 cell transformation. **Mutation Research**, vol 493: 161-166. 2001.
- SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMA, F.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detction of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, 393: 133-139. 1997.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, 31: 9-15. 1975.
- SEMARH. Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Distrito Federal. Livro virtual: Olhares sobre o Lago Paranoá (2005). <http://www.semarh.df.gov.br/> Acesso em 20/07/2006.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells **Experimental Cell Research**, 175, 1: 184-191. 1988.
- SONE, K.; HINAGO, M.; KITAYAMA, A.; MOROKUMA, J.; UENO, N.; WATANABE, H.; IGUCHI, T.; Effects of 17 B-estradiol, nonilfenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. **General ans Comparative Endocrinology**, 138: 228-236. 2004.
- SOUZA, T. DA S.; FONTANELLI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents. **Mutation Research**, 605:87-93. 2006.
- SUMPTER, J.P.; Xenoendocrine disrupters-environmental impacts. **Toxicology Letters**, vol 102-103: 337-342. 1998.

- UGUZ, C.; ISCAN, M.; ERGUVEN, A.; ISGOR, B.; TOGAN, I.; The bioaccumulation of nonilfenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) **Environment Research**, vol 92: 262- 270. 2003.
- VERNIER, P.; MARON, S.; CANOVA, S.; Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzol [*a*] pyrene. **Mutation Research**, vol. 390: 33-44. 1997.
- VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I. M. DE; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A. P.; SILVA, J. DA Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2006.
- WEIS, P.; WEIS, J.S.; COUCH, J.; DANIELS, C.; CHEN, T.; Pathological and Genotoxicological observations in Oysters ( *Crassostrea virginica*) living on chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. **Marine Environmental Research**, vol 39: 275-278. 1995.
- WESTER W. P.; VAN DER VEN, L. T. M.; VOS G. J.; Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disrupters. **Toxicology**, 205: 27-32. 2004

## **8. ANEXOS**

**Anexo 1.** Tabela contendo o número total de espécimes de peixes coletados e o número absoluto de micronúcleos encontrados em cada espécie.

**Dados absolutos do teste de MN (total de peixes coletados)**

Nº de espécimes	Acará	Tucunaré	Traíra	Lambari	Tilápia	Carpa	Saguiru
1	4	2	0	0	0	0	0
2	1	1	1	2	0	0	0
3	0	4	3	1	0	0	0
4	1	2	0	0	0	1	1
5	0	3	0	1	0	2	0
6	1	7	3	1	0	0	3
7	0	1	7	2	2	0	2
8	0	2	0	0	0	2	1
9	4	0	1	1	0	0	1
10	0	2	1	4	2	0	0
11	0	1	2	1	4	1	2
12	2	0	1	0	3	3	1
13	1	5	0	0	0	6	3
14	2	2	1	0	0	0	2
15	0	3	1	0	0	0	0
16	0	2	6	1	0	0	1
17	2	0	1	3	1	1	1
18	0	0	1	1	2		0
19	0	0	1	2	0		1
20	0	1	6	1	4		0
21	1	2		0	0		0
22	0	1		2	1		0
23				0	1		0
24				0	2		0
25				0	1		2
26				2	0		0
27				0	0		2
28				5	1		1
29				1	1		0
30				3	0		0
31					3		1
32					0		0
33							0
34							0
35							0
nº de MN / esp.	19	41	36	34	28	16	25

**Anexo 2.** Tabelas contendo o número de indivíduos coletados e a classificação dos níveis de danos no DNA de cada espécie coletada no Lago Paranoá.

ACARÁ						
Nº da lam.	N0	N1	N2	N3	N4	TOTAL
1	80	20	0	0	0	100
2	64	36	0	0	0	100
3	23	52	25	0	0	100
4	30	70	0	0	0	100
5	07	32	61	0	0	100
6	73	19	05	02	01	100
7	0	38	40	21	01	100
8	0	56	46	0	0	100
9	100	0	0	0	0	100
10	100	0	0	0	0	100
11	79	21	0	0	0	100
12	100	0	0	0	0	100
13	64	36	0	0	0	100
14	100	0	0	0	0	100
15	76	24	0	0	0	100

TUCUNARÉ						
Nº da lam.	N0	N1	N2	N3	N4	TOTAL
1	28	40	19	13	0	100
2	70	25	04	1	0	100
3	29	22	15	18	16	100
4	45	26	14	14	1	100
5	27	42	30	1	0	100
6	60	20	12	6	2	100
7	36	18	26	17	3	100
8	41	27	23	8	1	100
9	47	43	10	0	0	100
10	55	37	08	0	0	100
11	13	42	45	0	0	100
12	02	85	13	0	0	100
13	69	31	0	0	0	100
14	62	32	06	0	0	100
15	45	46	09	0	0	100
16	40	27	25	8	0	100

LAMBARI						
Nº da lam.	N0	N1	N2	N3	N4	TOTAL

1	100	0	0	0	0	100
2	73	27	0	0	0	100
3	96	4	0	0	0	100
4	91	5	4	0	0	100
5	92	4	4	0	0	100
6	60	22	9	8	1	100
7	100	0	0	0	0	100
8	100	0	0	0	0	100
9	100	0	0	0	0	100
10	100	0	0	0	0	100
11	97	3	0	0	0	100
12	83	17	0	0	0	100
13	96	4	0	0	0	100
14	80	17	3	0	0	100
15	40	42	18	0	0	100
16	0	73	25	2	0	100
17	0	92	8	0	0	100
18	4	6	65	25	0	100
19	19	16	58	7	0	100
20	90	7	3	0	0	100
21	100	0	0	0	0	100
22	13	29	53	5	0	100
23	100	0	0	0	0	100
24	100	0	0	0	0	100
25	94	6	0	0	0	100

TILÁPIA						
Nº da lam.	N0	N1	N2	N3	N4	TOTAL
1	17	61	21	1	0	100
2	100	0	0	0	0	100
3	100	0	0	0	0	100
4	100	0	0	0	0	100
5	61	39	0	0	0	100
6	100	0	0	0	0	100
7	83	17	0	0	0	100
8	100	0	0	0	0	100
9	100	0	0	0	0	100
10	87	13	0	0	0	100
11	0	82	18	0	0	100
12	0	93	7	0	0	100
13	11	76	13	0	0	100
14	58	42	0	0	0	100
15	77	23	0	0	0	100
16	68	32	0	0	0	100
17	0	87	13	0	0	100
18	91	6	3	0	0	100
19	56	21	23	0	0	100
20	100	0	0	0	0	100

21	100	0	0	0	0	100
22	80	13	4	3	0	100

SAGUIRU						
Nº da lam.	N0	N1	N2	N3	N4	TOTAL
1	62	18	14	6	0	100
2	8	56	36	0	0	100
3	13	78	9	0	0	100
4	3	79	18	0	0	100
5	12	54	26	8	0	100
6	0	96	4	0	0	100
7	0	71	19	8	2	100
8	76	24	0	0	0	100
9	42	44	14	0	0	100
10	38	53	9	0	0	100
11	0	65	35	0	0	100
12	0	78	22	0	0	100
13	6	8	57	27	2	100
14	6	60	32	2	0	100
15	0	13	29	57	1	100
16	7	27	57	9	0	100
17	100	0	0	0	0	100
18	93	7	0	0	0	100

**Anexo 3.** Tabelas com os resultados estatístico do micronúcleo realizados nas espécies do lago Paranoá, através do programa de estatística básica Mann Whitney – U, onde em vermelho estão representados os resultados significantes e em azul os não significantes.

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Tucunaré											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			14	2,22989940	0,0257610	2,32623910	0,020012		22	22	0,0254928
N	400	590	7	6	31	9	01				12

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Traíra											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			15	1,63698017	0,1016444	1,72941780	0,0837439		22	20	0,1047620
N	408	495	5	6	49	1	89				92

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Lambari											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			28	0,88904136	0,3739875	0,94847792	0,3428933		22	30	0,3822024
N	535	843	2	4	26	4	32				76

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Tilápia											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			35	0,017604	0,9859545	0,0194679	0,9844679		22	32	0,9930387
N	606	879	1	47	23	16	24				74

Mann-Whitney U Test

By variable GRUPOS										
Acará x Carpa										
	Rank Sum	Rank Sum					Z	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
M	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level			
N	444,5	335,5	182,5	0,1274492	0,8985856	0,1415996	0,88739711	22	17	0,899781942
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Acará x Saguiru										
	Rank Sum	Rank Sum					Z	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
M	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level			
N	646	1007	377	0,1311357	0,8956687	0,1446636	0,8849774	22	35	0,902982414
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Tucunará x Traira										
	Rank Sum	Rank Sum					Z	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
M	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level			
N	500	403	193	0,6799763	0,4965243	0,7006038	0,483555377	22	20	0,508500099
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Tucunará x Lambari										
	Rank Sum	Rank Sum					Z	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
M	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level			
N	672	706	241	1,6484308	0,0992740	1,7065715	0,087911427	22	30	0,101509079
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Tucunará x Tilápia										
	Rank Sum	Rank Sum					Z	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
M	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level			
N	738	747	219	2,3413944	0,0192179	2,4604771	0,013880487	22	32	0,018754713
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Tucunará x Carpa										
	Rank Sum	Rank Sum					Z	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
M	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level			
N	513,5	266,5	113,5	2,0816712	0,0373804	2,1676230	0,03019472	22	17	0,036304705

By variable GRUPOS										
Tucunaré x Saguiru										
	Rank Sum	Rank Sum			Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2	exact p
M			218,	2,7292637	0,0063510	2,8751060	0,004041	22	35	0,0056598
N	804,5	848,5	5	83	59	96	58			63
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Traíra x Lambari										
	Rank Sum	Rank Sum			Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2	exact p
M			25	0,910935	0,3623360	0,9538323	0,3401757	20	30	0,3709623
N	556	719	4	76	69	28	18			22
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Traíra x Tilápia										
	Rank Sum	Rank Sum			Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2	exact p
M			22	1,7680337	0,0770647	1,8758736	0,0606817	20	32	0,078550
N	624	754	6	43	67	85	08			54
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Traíra x Carpa										
	Rank Sum	Rank Sum			Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2	exact p
M			116,	1,630471	0,1030117	1,7202997	0,0853876	20	17	0,1035071
N	433,5	269,5	5	23	42	21	32			46
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Traíra x Saguiru										
	Rank Sum	Rank Sum			Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2	exact p
M			237,	1,968339	0,0490375	2,0977673	0,0359335	20	35	0,0484022
N	672,5	867,5	5	92	53	53	17			27
Mann-Whitney U Test										
By variable GRUPOS										
Lambari x Tilápia										
	Rank Sum	Rank Sum			Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2	exact p
M			41	0,9578415	0,3381499	1,0273089	0,3042827	30	32	0,3442034
N	1013	940	2	16	35	41	55			13
Mann-Whitney U Test										

By variable GRUPOS											
Lambari x Carpa											
	Rank Sum	Rank Sum			Z				Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			213,	0,9188254	0,3581937	0,9808086	0,3266945		30	17	0,3619489
N	761,5	366,5	5	48	85	16	48				67
Mann-Whitney U Test											
By variable GRUPOS											
Lambari x Saguiru											
	Rank Sum	Rank Sum			Z				Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			43	1,1974720	0,2311314	1,2863346	0,1983356		30	35	0,2354553
N	1081	1064	4	95	64	34	03				49
Mann-Whitney U Test											
By variable GRUPOS											
Tilápia x Carpa											
	Rank Sum	Rank Sum			Z				Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			26	0,1260252	0,8997127	0,1404266	0,8883238		32	17	0,9089921
N	806	419	6	15	41	06	43				71
Mann-Whitney U Test											
By variable GRUPOS											
Tilapia x Saguiru											
	Rank Sum	Rank Sum			Z				Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			54	0,1506289	0,8802694	0,1665570	0,867719		32	35	0,8859900
N	1100	1178	8	39	08	14	65				24
Mann-Whitney U Test											
By variable GRUPOS											
Carpa x Saguiru											
	Rank Sum	Rank Sum			Z				Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
M			295,	0,0390143	0,9688792	0,0432980	0,9654642		17	35	0,9691996
N	448,5	929,5	5	36	23	17	34				57

**Anexo 4.** Resultado estatístico das frequências de anormalidades nucleares realizado nas espécies de peixes do Lago Paranoá, avaliadas pelo programa de estatística básica Mann-Whitney – U, onde em vermelho estão selecionados os resultados significativos e em azul os não significativos.

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Tucunaré											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
A			17	-	0,0283877	-	0,027999		24	23	0,028200
N	473	655	3	2,19199	2	2,19739	6				8

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Traíra											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		Group 1	Group 2	
AN	432,5	557,5	132,5	-2,5338	0,01128806	-2,5425	0,0110108		24	20	0,010264

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Lambari											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
A			11	3,50534	0,0004566	3,53462	0,000408		24	24	0,000300
N	758	418	8	1	5	3	9				6

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Tilapia											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		Group 1	Group 2	
NA	336,5	839,5	36,5	-5,18584	0,000000	-5,19191	0,00E+00		24	24	0,000000

Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS Acará x Carpa											
	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level		1	2	
A			18	0,63510	0,5253629	0,63901	0,522817		24	17	0,538164
N	528	333	0	7	7	6	3				4

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Acará X Saguiru

	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2		
A			181,	2,19599	0,028099	2,21025	0,027094	24	24	0,027147	
N	694,5	481,5	5	3	6	5	5			1	

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tucunará x Traíra

	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2		
A			20	-	0,6091207	-	0,608198	23	20	0,621114	
N	485	461	9	0,51133	3	0,51265	5			3	

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tucunará x Lambari

	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2		
AN	765	363	63	4,532941	6,00E-06	4,558578	0,000005	23	24	0,000001	

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tucunará x Tilápia

	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group 1	Group 2		
AN	325,5	802,5	49,5	-4,82024	0,000001	-4,82345	1,00E-06	23	24	0,000000	

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tucunará x Carpa

	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	1	2		
A			110,	2,32556	0,0200477	2,33368	0,019618	23	17	0,018804	
N	556,5	263,5	5	9	7	3	5			2	

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tucunará x Saguiru

	Rank Sum	Rank Sum				Z			Valid N Group	Valid N Group	2*1sided exact p
	Group 1	Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Group	Group		

A			100,	3,73488	0,0001881	3,75064	0,000176	1	2	
N	727,5	400,5	5	8	2	3	7	23	24	9,801E-05

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Traíra x Lambari

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	660	330	30	4,949748	0,000001	4,973462	1,00E-06	20	24	0,000000

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Traíra x Tilapia

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	291	699	81	-3,74767	0,0001788	-3,74978	0,0001773	20	24	9,12E-05

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Traíra x Carpa

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
A			7	2,83427	0,0045958	2,84339	0,004466	1	2	0,003911
N	473	230	7	7	2	2	4	20	17	1

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Traíra x Saguiru

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	626	364	64	4,14836	3,3573E-05	4,166161	3,106E-05	20	24	1,054E-05

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Lambari x Tilapia

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	309	867	9	-5,75288	0,0000E+00	-5,76982	0,000000	24	24	0,000000

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Lambari x Carpa

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	396	465	96	-2,85798	0,00426618	-2,89104	0,0038423	24	17	0,0036361

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Lambari x Saguiru

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
NA	507	669	207	-1,67019	0,0948912	-1,69584	0,0899266	24	24	0,0972042

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tilapia x Carpa

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	684	177	24	4,763305	2E-06	4,769541	2,00E-06	24	17	0,000000

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Tilapia x Saguiru

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
AN	857,5	318,5	18,5	5,556996	0,0000	5,568342	0,0000	24	24	0,0000

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Carpa x Saguiru

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
A N	415	446	14 6	1,53484 3	0,1248323 8	1,54914 5	0,121356 7	1 17	2 24	0,129147 2

**Anexo 5.** Tabelas contendo os resultados da análise estatística do nonilfenol, realizada pelo programa de estatística básica Mann Whitney – U. Em azul estão selecionados os valores de p, demonstrando que as diferenças entre as freqüências de micronúcleos não são significativas ( $p > 0,05$ ).

Mann-Whitney U Test By variable VAR1 Controle x 1µL/L										
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
MN	104,5	105,5	49,5	-0,0378	0,96985	-0,04339	0,965388	10	10	0,970512

Mann-Whitney U Test By variable VAR1 Controle x 10 µL/L										
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
MN	100,5	109,5	45,5	-0,34017	0,733732	-0,3823	0,702241	10	10	0,739364

Mann-Whitney U Test By variable VAR1 Controle x 16 µL/L										
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
MN	109,5	100,5	45,5	0,340168	0,733732	0,403556	0,686542	10	10	0,739364

**Anexo 6.** Tabelas contendo os resultados da análise estatística da citotoxicidade do nonilfenol, realizada pelo programa de estatística básica Mann Whitney – U. Em azul estão selecionados os valores de p não significativos ( $p > 0,05$ ) e em vermelhos os valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
controle x 1  $\mu\text{L/L}$

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1side exact p
	Group 1	Group 2						1	2	
CITOTOX _	93,5	116,5	38,5	0,86932	0,38468	-	0,379982	10	10	0,393048

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
controle x 10  $\mu\text{L/L}$

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1side exact p
	Group 1	Group 2						1	2	
CITOTOX _	73,5	136,5	18,5	2,38118	0,017263	-2,4002	0,016392	10	10	0,01469

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
controle x 16  $\mu\text{L/L}$

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1side exact p
	Group 1	Group 2						1	2	
CITOTOX_ _	77,5	132,5	22,5	-2,0788	0,037643	2,08745	0,036855	10	10	0,035463

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
1  $\mu\text{L/L}$  x 10  $\mu\text{L/L}$

	Rank Sum	Rank Sum	U	Z	p-level	adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1side exact p
	Group 1	Group 2						1	2	
CITOTOX_ _	78	132	23	2,04101	0,041258	2,04408	0,040953	10	10	0,043257

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS

1 µL/L x 16 µL/L										
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted d	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
CITOTOX_	87,5	122,5	32,5	-1,32288	0,185886	1,3258 7	0,1848 92	10	10	0,190316
Mann-Whitney U Test By variable GRUPOS										
10 µL/L x 16 µL/L										
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1side d exact p
CITOTOX _	118,5	91,5	36, 5	1,02050 4	0,30749 7	1,02088 8	0,30731 5	10	10	0,31499 9

**Anexo 7.** Tabelas contendo os resultados da análise estatística da morfometria das gônadas expostas ao nonilfenol, realizada pelo programa de estatística básica Mann Whitney – U. Em azul estão selecionados os valores de p não significativos ( $P < 0,05$ ) e em vermelhos os valores significativos ( $P < 0,05$ ).

Mann-Whitney U Test  
By variable GRUPOS  
Controle x 1 µL/L

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
TAM	882,5	947,5	417,5	-0,48049	0,63088	-0,4805	0,630875	30	30	0,633267

Mann-Whitney U Test (mn camund..sta)  
By variable GRUPOS  
Controle x 10 µL/L

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
TAM	1046	784	319	1,93676	0,052784	1,93676	0,052784	30	30	0,053235

Mann-Whitney U Test (mn camund..sta)  
By variable GRUPOS  
Controle x 16 µL/L

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
TAM	556	1274	91	-5,30761	0	-5,30761	0,00E+00	30	30	7,5E-09

Mann-Whitney U Test (mn camund..sta)  
By variable GRUPOS  
1 µL/L x 10 µL/L

	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N Group 1	Valid N Group 2	2*1sided exact p
TAM	1064	766	301	2,202879	0,02761	2,202879	0,02761	30	30	0,027381

Brasília, fevereiro de 2007.

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Cesar Koppe Grisolia

---

Carla Leticia Gediel Rivero