

AValiação DA GENOTOXICIDADE DO RIO PARDINHO UTILIZANDO O ENSAIO COMETA EM *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819

Fernanda Fleig Zenkner¹
Tatiane de Aquino²
Fernando Abling¹
Danieli Rosane Dallemole¹
Andreas Köhler³
Daniel Prá⁴
Alexandre Rieger⁴

RESUMO

O Rio Pardinho é o principal recurso hídrico que abastece a cidade de Santa Cruz do Sul, além de drenar diversos municípios da região do Vale do Rio Pardo. Sofre influencia das atividades desenvolvidas às suas margens, o que resulta em impactos negativos na qualidade da água. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico de quatro pontos amostrais ao longo do Rio Pardinho, da sua nascente a sua foz, (P1, P2, P3 e P4) em diferentes estações do ano utilizando o Ensaio Cometa com *Astyanax fasciatus*, peixe nativo da região. Em cada ponto foram coletados em média $12,3 \pm 3,7$ peixes por estação do ano. Os resultados do Ensaio Cometa variaram conforme a estação, mas em geral o P4 apresentou os maiores valores de Índice de Dano (ID). Isso indica que em direção à foz do Rio Pardinho existe algum fator que influencia na qualidade da água do rio. Entretanto, o aumento da genotoxicidade ao longo do rio não foi linear, pois o P2 também apresentou alto valor de ID em todas as estações, exceto no outono. Dessa forma acredita-se que não só nos centros urbanos, mas na área rural também existam poluentes que chegam ao rio afetando a biota aquática.

Palavras-chave: Rio Pardinho, Ensaio Cometa, *Astyanax fasciatus*, Genotoxicidade.

¹Acadêmico(a) do Curso de Ciências Biológicas da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC;

²Bióloga, Pós-graduanda em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.

³Laboratório de Entomologia, Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.

⁴Laboratório de Genética e Biotecnologia, Departamento de Biologia e Farmácia, Av. Independência, 2293 - Sala 1206, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, CEP 96815-900. E-mail de contato: rieger@unisc.br

EVALUATION OF PARDINHO RIVER WATER GENOTOXICITY USING THE COMET ASSAY IN *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819

ABSTRACT

The Pardinho River is the main hydric resource that supplies Santa Cruz do Sul, draining several cities in the region of Vale do Rio Pardo. The river is influenced by the activities developed on its banks, which result in negative impact on water quality. This study aimed to evaluate the genotoxicity of four sampling sites along Pardinho River from its source to mouth (P1, P2, P3 e P4) in different seasons using the Comet Assay with *Astyanax fasciatus*, a fish native to the region. At each sampling site were collected 12.3 ± 3.7 fish per season. The Comet Assay results varied according to the season, but in general P4 showed the highest Damage Index (DI) values, which indicates that toward the river mouth there is something that affects the river water quality. However, it was noted that the increase of genotoxicity along the river was not linear, as P2 also presented a high DI value at all seasons except autumn. Thus, probably not only in urban areas but also in rural areas there are pollutants reaching the river and affecting aquatic organisms.

Keywords: Pardinho River, Comet Assay, *Astyanax fasciatus*, genotoxicity.

INTRODUÇÃO

O Rio Pardinho constitui o principal recurso hídrico que abastece o município de Santa Cruz do Sul, além de drenar parte dos municípios de Boqueirão do Leão, Gramado Xavier, Herveiras, Sinimbu, Venâncio Aires e Vera Cruz. Diferentes estudos que avaliaram aspectos físicos, químicos e biológicos da água apontaram altos níveis de poluição em diversos pontos do rio (WETZEL et al., 2008; MACHADO, 2004; GOETTEMS, 2003; WETZEL et al., 2002; RATHKE, 2001; LOBO e COSTA, 1997).

Em relação à qualidade das águas da Bacia Hidrográfica, dados do Comitê Pardo (2008) mostram que a influência antrópica é determinante neste sentido. No meio urbano, os principais agentes poluentes são provenientes do lançamento de esgotos domésticos não depurados, efluentes industriais e resíduos sólidos, além da própria drenagem pluvial urbana, que ocorrem de forma concentrada. Já, o meio rural tem como principais contaminantes os fertilizantes e agrotóxicos utilizados nas lavouras de arroz, soja, fumo e milho que são estabelecidas as suas margens e de seus afluentes.

Os efluentes oriundos das cidades que margeiam o Rio Pardinho são lançados diretamente nele ou por arroios que nele desembocam. Neste contexto, os esgotos do município de Santa Cruz do Sul constituem a principal carga poluidora da Sub-Bacia do Rio Pardinho (ECOPLAN, 2005), pois é o que apresenta o maior número de habitantes, grande urbanização (> 80%) e também o maior desenvolvimento industrial do Vale do Rio Pardo (Conselho Regional de Desenvolvimento do Vale do Rio Pardo, 1998).

De acordo com dados do ano de 2008 (WETZEL et al., 2008), e baseando-se na resolução do CONAMA 357/2005 determinados pontos do Rio Pardinho variaram entre as classes 2, 3 e 4, sendo que alguns pontos, independentemente da época do ano, permaneceram sempre na classe 4, ou seja, águas destinadas apenas à navegação e à

harmonia paisagística. Assim, o impacto causado pela poluição da água na biota deve ser avaliado diretamente, visto que os sistemas biológicos são alvos da ação dos tóxicos e apresentam resposta integrada ao seu ambiente. Além disso, fornecem informações importantes que não são detectadas nas análises físico-químicas das amostras ambientais (FRENZILLI *et al.*, 2009). Desta forma, dados ecotoxicológicos confirmaram a poluição do Rio Pardinho (Wetzel *et al.*, 2008), porém ensaios de genotoxicidade são recentes e vem sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o teste de micronúcleos em peixes coletados neste rio (ZENKNER *et al.*, 2011) e em sementes de *Allium cepa* expostas a amostras de águas de arroios urbanos que nele desembocam (ATHANÁSIO, 2012).

A relevância da detecção dos riscos genotóxicos associados com a poluição da água foi primeiramente percebida no fim dos anos 70, quando novos métodos foram desenvolvidos para monitorar a presença de produtos lesivos ao DNA no ambiente aquático. Esses testes avaliam lesões no DNA que são passíveis de correção, e não trazem maiores consequências ao organismo se forem reparadas de forma correta. Entretanto, se isso não acontecer, as quebras dão chances para as aberrações cromossômicas, que podem acarretar morte celular, e levar a condições fisiopatológicas severas (JHA, 2008).

As alterações no DNA dos organismos podem resultar em sérias consequências para o ecossistema, já que em nível individual lesam células e órgãos dos seres vivos, podendo afetar inclusive sua função reprodutiva, implicando danos para a população e a comunidade (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011). Um dos testes mais utilizados atualmente para avaliar danos no DNA é o Ensaio Cometa (EC), que apresenta sensibilidade na detecção de lesões mesmo em organismos expostos a baixas concentrações de toxinas, além de ser realizado em células individuais não proliferativas (PRÁ *et al.*, 2005). Adicionalmente, apresenta bons resultados a partir de um pequeno número de células analisadas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Em organismos aquáticos, o Ensaio Cometa é frequentemente aplicado em células sanguíneas de peixes. Devido à sua importância na cadeia alimentar, a utilização desses animais no monitoramento da poluição de ambientes aquáticos é de extrema relevância (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011). Peixes são organismos bioconcentradores, e muitos contaminantes, mesmo em baixas concentrações, podem afetar sua fisiologia e capacidade de sobrevivência (GRISOLIA *et al.*, 2009). Além disso, parecem responder à xenobióticos da mesma maneira que vertebrados superiores, sendo rotineiramente utilizados como organismos sentinela em estudos de monitoramento de água doce (Polard *et al.*, 2011).

A respeito das espécies de peixes nativos do Rio Pardinho, grande representatividade numérica de lambaris do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 tem sido comum no local, destacando-se entre eles, o lambari do rabo vermelho, *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (RIBEIRO; KÖHLER, 2007). Tal característica se dá pelo fato das espécies apresentarem ciclos de vida dinâmicos com elevado potencial reprodutivo e oportunismo trófico, fato interessante para o uso do gênero como modelo biológico para diferentes estudos. Além disso, o gênero apresenta comportamento reofílico, ou seja, realiza apenas curtas migrações reprodutivas durante os períodos de maior precipitação, não variando muito sua ocorrência nas diferentes faixas dos corpos hídricos (RAMSDORF, 2007). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial genotóxico de 4 pontos distintos ao longo do Rio Pardinho, Vale do Rio Pardo, RS, em diferentes estações do ano, utilizando o Ensaio Cometa em exemplares de *A. fasciatus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do estudo

A Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Pardinho é um componente da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo e está localizada na região central do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas 52°21'30" a 52°40'30" de longitude oeste e 29°14'30" de latitude sul, possuindo uma área superficial de drenagem de 1.085,15 km² (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Ao longo de todo o seu trajeto, desde a nascente até a foz, a água do Rio Pardinho recebe influência de fontes poluidoras diversas, peculiares a cada região. Sendo assim, foram escolhidos 4 pontos de coleta ao longo do Rio Pardinho, RS, Brasil (Pontos 1, 2, 3 e 4), conforme a Figura 1.

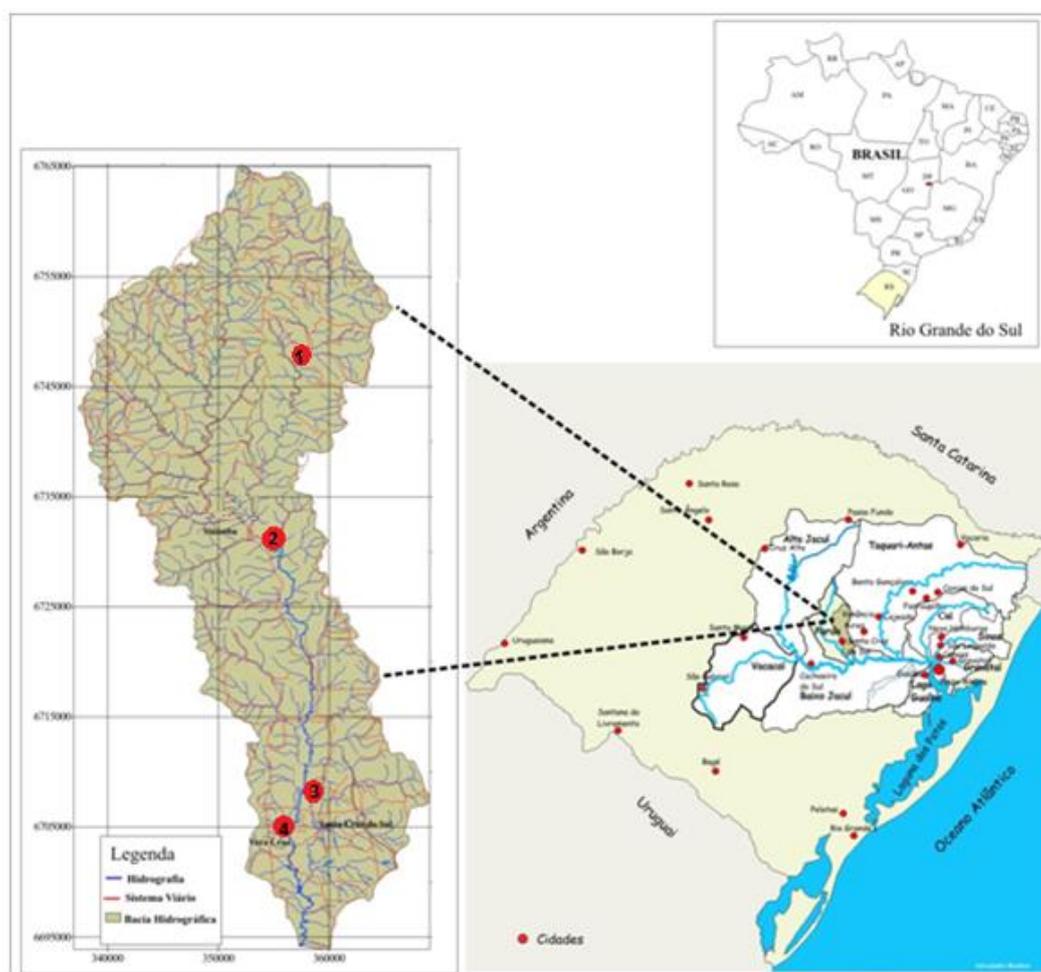


Figura 1 - Sub-Bacia Hidrográfica do Rio Pardinho, com a identificação dos 4 pontos de coleta. **Fonte:** Núcleo de Planejamento e Gestão da UNISC.

O ponto 1 (P1) localiza-se logo acima do Salto do Rio Pardinho, município de Sinimbu (29°22'48,64" S e 52°32'27,71" O). O principal tipo de contaminação nessa área deve-se a agroquímicos provenientes das lavouras de pequenas propriedades rurais em que são cultivados milho, arroz e principalmente tabaco, além de uma pequena contaminação por resíduos domésticos oriundos de pequenos vilarejos.

Já ponto 2 (P2) é localizado na Linha Primavera, município de Sinimbu (29°30'40,28''S e 52°32'7,08''O). Esse ponto também sofre contaminação por agroquímicos provenientes de lavouras, especialmente de tabaco e uma pequena quantidade de resíduos domésticos originados na zona rural do próprio município.

O ponto 3 (P3) encontra-se na divisa entre os municípios de Vera Cruz (Linha Capão) e Santa Cruz do Sul (Dona Carlota), junto da captação de água para abastecimento da cidade de Vera Cruz (29°43'56,24''S e 52°27'51,22''O). É caracterizado por receber forte carga poluidora proveniente das descargas de rejeitos domésticos e industriais especialmente de Santa Cruz do Sul. Além disso, sofre impacto de agroquímicos diluídos ao longo do rio.

E, por fim, o ponto 4 (P4) está localizado após a cidade de Santa Cruz do Sul e de Vera Cruz (29°47'15,41''S e 52°27'39,91''O) recebendo grande carga de efluentes domésticos e industriais desses municípios. Além disso, próximo a esse ponto encontram-se diversas áreas com monocultura de arroz, o que acaba impactando o local em função dos agroquímicos utilizados.

Coleta dos animais e preparo das amostras

A coleta dos indivíduos de *A. fasciatus* foi realizada durante diferentes estações do ano de 2012 (verão, outono, inverno e primavera) através de linhas de pesca com anzóis. Amostras de sangue periférico foram obtidas através de punção cardíaca utilizando seringa heparinizada e imediatamente transferidas para um tubo contendo meio RPMI-1640 na proporção 1:120, sendo os tubos com as amostras protegidos da luz. As amostras foram armazenadas em caixa refrigerada sem contato direto com o gelo, até o início do seu processamento que ocorre no máximo em 6 horas.

Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado na versão alcalina de acordo com o protocolo descrito a seguir, adaptado de Groff et al. (2010). O sangue diluído em meio RPMI-1640 foi misturado com agarose de baixo ponto de fusão (LMPA) na concentração final de 1%, sendo utilizados 5µL de sangue e 95µL de agarose para cada lâmina pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (NMPA; 1,5%). Após espalhar a mistura na lâmina, uma lamínula foi adicionada e as lâminas foram incubadas a 4°C por 10 minutos para a solidificação da agarose. As lâminas foram então colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM TRIS, pH 10; 1% Triton X-100, 10% DMSO) por 2 horas a 4°C. Após, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em PBS e transferidas para a cuba de eletroforese onde permaneceram por 15 minutos em tampão alcalino (50mM NaOH, 1mM Na₂EDTA; pH 12) para o desenovelamento do DNA, sendo imediatamente submetidas a eletroforese (0,7 V/cm, 300 mA) por mais 15 minutos. Subsequentemente as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) e fixadas. Para a visualização dos danos no DNA as lâminas foram coradas com solução de nitrato de prata por 30 minutos, à 37°C e com agitação de 105 rpm. A análise das lâminas foi realizada através de microscopia óptica convencional, em aumento de 100x. Foram analisadas duas lâminas por amostra sendo contados 50 nucleoides por lâmina. Os nucleoides foram classificados em cinco classes, de acordo com a extensão do dano, sendo a classe 0 correspondente à nucleoides sem dano, e a classe 4 àqueles com dano máximo. Após, foram calculados Frequência e Índice de Danos (FD e ID, respectivamente) de cada indivíduo. A FD é obtida pelo nº de nucleoides com dano em relação ao total, enquanto que o ID considera os diferentes tipos de dano em cada

classe, de modo que quanto maior o dano presente no nucleóide, maior será a sua contribuição para o ID. Assim o ID calculado para uma contagem de 100 nucleóides por amostra utiliza a seguinte fórmula:

$$ID = \text{Class 1} \times 1 + \text{Class 2} \times 2 + \text{Class 3} \times 3 + \text{Class 4} \times 4, \text{ podendo variar de 0 a 400.}$$

Análise estatística

Os resultados do Ensaio Cometa expressos em ID e FD foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para múltiplas comparações sendo adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Para a realização dos testes foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 5.1.

RESULTADOS

Foram coletados um total de 197 exemplares de *A. fasciatus*, em média $12,3 \pm 3,7$ espécimes por ponto amostrado em cada uma das 4 estações do ano de 2012. Os resultados de FD e ID obtidos pelo EC encontram-se sumariados na Tabela 1.

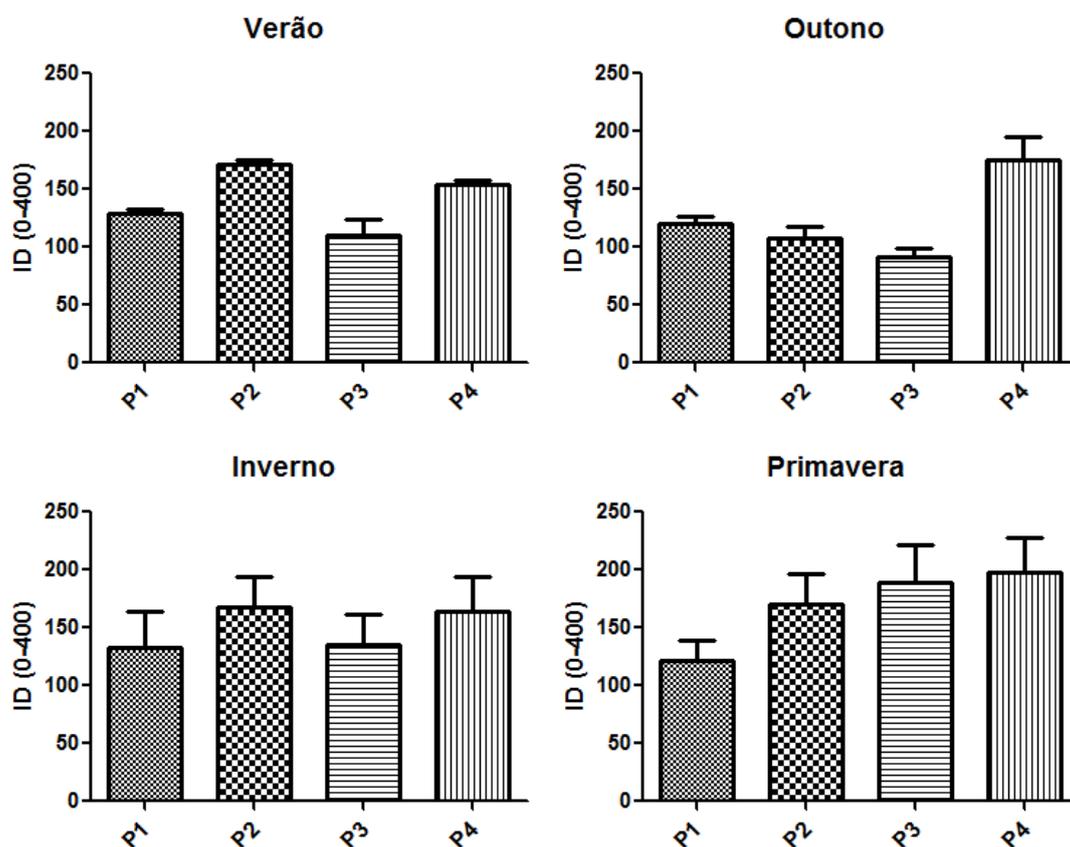
Tabela 1 - Resultados do Ensaio Cometa realizado em exemplares de *Astyanax fasciatus* coletados em 4 pontos distintos do Rio Pardinho (P1, P2, P3 e P4) em diferentes estações do ano de 2012.

	P1	P2	P3	P4	P
Verão					
ID	$128,9 \pm 15,35$	$171,5 \pm 16,51$	$109,6 \pm 44,26$	$153,9 \pm 12,48$	$P < 0,0001$ ^{a, c, d, f}
FD	$59,53 \pm 4,44$	$60,47 \pm 5,49$	$50,30 \pm 14,20$	$56,40 \pm 2,38$	$P < 0,05$
Outono					
ID	$119,7 \pm 25,32$	$108,3 \pm 35,35$	$92,07 \pm 26,31$	$175,0 \pm 28,28$	$P < 0,05$ ^f
FD	$54,00 \pm 4,52$	$50,47 \pm 11,30$	$47,27 \pm 7,58$	$73,50 \pm 3,54$	$P < 0,01$ ^f
Inverno					
ID	$132,1 \pm 31,45$	$168,1 \pm 26,11$	$134,7 \pm 27,23$	$163,4 \pm 30,09$	$P < 0,01$ ^{a, d}
FD	$55,40 \pm 10,47$	$62,40 \pm 7,57$	$63,07 \pm 8,82$	$65,40 \pm 8,41$	$P < 0,05$ ^c
Primavera					
ID	$120,9 \pm 17,89$	$169,9 \pm 26,71$	$189,2 \pm 31,64$	$197,4 \pm 30,35$	$P < 0,0001$ ^{a, b, c}
FD	$58,80 \pm 3,15$	$70,90 \pm 6,03$	$76,40 \pm 5,87$	$73,20 \pm 6,71$	$P < 0,0001$ ^{a, b, c}

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$). ID= Índice de Dano, expresso em unidade arbitrária (0-400); FD= Frequência de Dano, expressa em percentual; ns: não significativo; a: P1 x P2; b: P1 x P3; c: P1 x P4; d: P2 x P3; e: P2 x P4; f: P3 x P4.

No verão, o valor de ID foi significativamente mais elevado em P2 e P4. No outono o ID estava significativamente aumentado somente no P4. Na estação seguinte, no inverno, o P2 voltou a apresentar aumento do ID, e no P4 o mesmo continuou elevado. Já na primavera, novamente o P2 e o P4 apresentaram maior ID, acompanhados do P3, sendo todos significativamente diferentes do P1. Os resultados destacam que essa estação é a que apresenta um maior aumento da genotoxicidade ao longo do rio.

Através dos resultados do Ensaio Cometa nota-se que, em geral, o P4 apresenta os maiores valores de ID, indicando que na direção da foz do Rio Pardinho algum fator é responsável por esse aumento. Entretanto, o incremento na genotoxicidade ao longo do rio, ou seja, do P1 (mais próximo à nascente) em direção ao P4 (mais próximo à foz), não cresce linearmente na maioria das estações, como pode ser observado na Figura 2.



ID: Índice de Dano em unidade arbitrária (0-400).

Figura 2 - Resultados do Ensaio Cometa expressos em Índice de Dano (ID) obtidos da avaliação dos quatro pontos de coleta no Rio Pardinho (P1, P2, P3, P4) nas diferentes estações do ano de 2012.

A variação da genotoxicidade em cada ponto de acordo com a estação do ano pode ser visualizada na Figura 3. Percebe-se que no P1 os valores de ID mantêm-se muito semelhantes em todas as estações. No P2, o ID diminui significativamente durante o outono ($P < 0,0001$). Já no P3, o ID apresentou aumento significativo durante a primavera quando comparado ao verão ($P < 0,001$) e ao outono ($P < 0,0001$), assim como no P4, onde a primavera também foi a estação com os maiores valores de ID, sendo significativamente superior ao verão ($P < 0,001$).

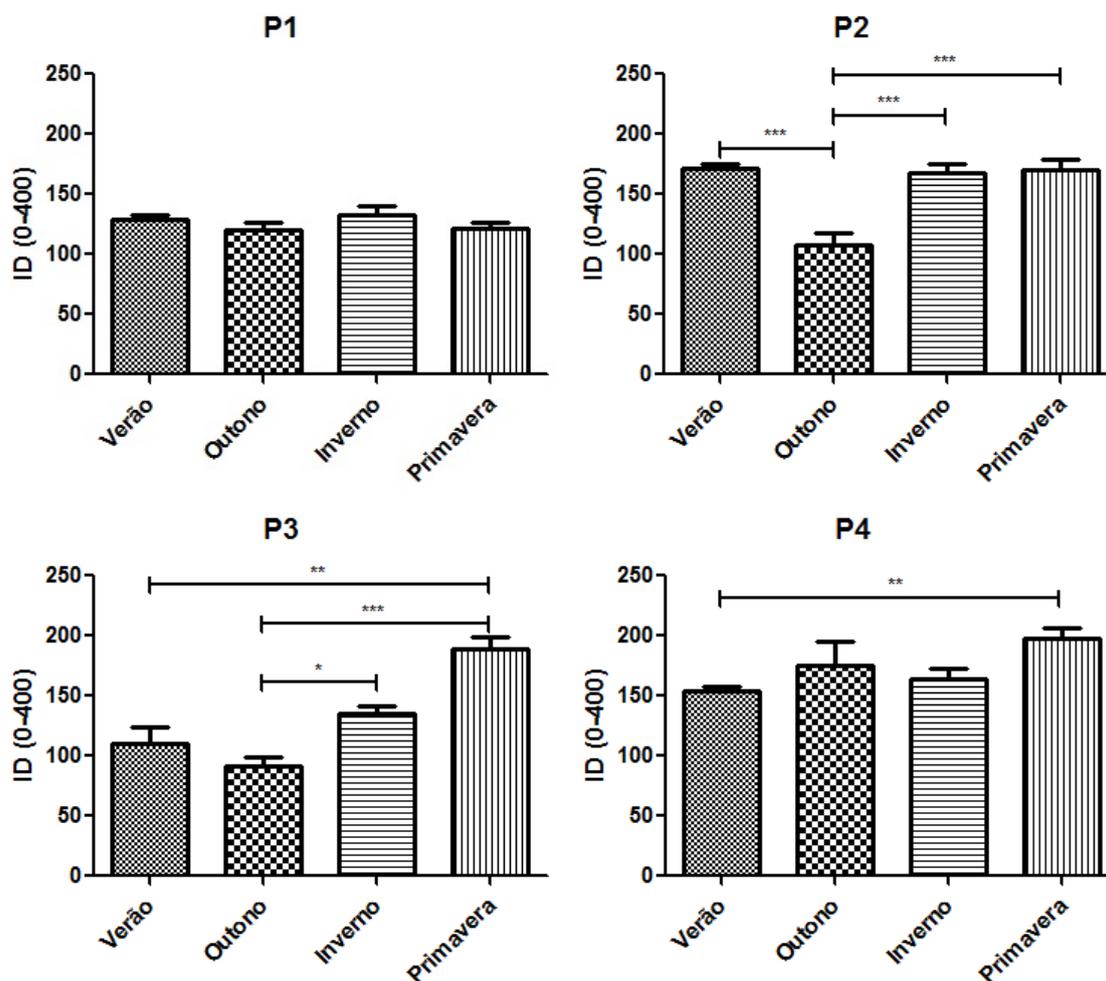


Figura 3 - Resultados do Ensaio Cometa expressos como índice de Dano (ID), mostrando a variação da genotoxicidade nos quatro pontos de coleta do Rio Pardinho (P1, P2, P3, P4) durante as diferentes estações do ano de 2012.

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0.05$). ID: Índice de Dano em unidade arbitrária (0-400). * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$.

DISCUSSÃO

Os pontos amostrados ao longo do Rio Pardinho apresentam diferentes impactos antropogênicos e os resultados mostraram que o aumento da genotoxicidade cresce de maneira não linear da nascente em direção à foz (Figura 2). Esse resultado sugere que não é apenas a urbanização que contribui para contaminação dos corpos hídricos, mas também na região rural os resíduos gerados pela agricultura e pecuária podem determinar impactos a serem considerados.

Os pontos P1 e P2 estão localizados no município de Sinimbu, que é predominantemente rural. Na região do P1 encontram-se pequenas propriedades onde o cultivo de subsistência é o mais encontrado, além da criação de poucos animais, como

suínos. Já no P2, destacam-se pequenas lavouras de tabaco que inclusive margeiam o Rio Pardinho. Sabe-se que a cultura do tabaco nesta região é geralmente acompanhada do cultivo de milho, que ocorre concomitante ou após o término da safra de tabaco (Heemann, 2009) e que alguns agrotóxicos, como o Imidacloprido, por exemplo, são comuns a ambas as culturas (COSMANN e DRUNKLER, 2012).

Assim, a variação de genotoxicidade nesses pontos conforme a época do ano pode estar associada ao fato de que as culturas agrícolas da região, como o tabaco, o milho e a soja, recebem diferentes cargas de agrotóxicos e fertilizantes que podem gerar resíduos tóxicos lixiviados ao leito do rio. Isso pode ocorrer especialmente na região do alto Rio Pardinho, que apresenta um declive acentuado, bem como a presença de solos do tipo Neossolos, caracterizados como de baixa profundidade e pouca capacidade de armazenamento de água, gerando grande quantidade de escoamento superficial (COMITÊ PARDO, 2013).

Os pontos amostrados neste trabalho já foram anteriormente monitorados quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos (MORETTO, 2011). Assim, segundo Moretto (2011), P1 e P2 apresentaram contaminação microbiológica caracterizada pelo aumento de coliformes termotolerantes, provavelmente de origem orgânica, provenientes de esterco animal, principalmente da suinocultura presente nesta região, ou de efluentes não tratados de pequenas propriedades localizadas a margem do Rio Pardinho e de seus afluentes, uma vez que esse efeito só foi encontrado em algumas estações do ano, como outono e primavera. De modo diferente, os pontos P3 e P4 também apresentaram níveis elevados de coliformes termotolerantes, mas de modo consistente em todas as estações do ano caracterizando um evidente efeito antropogênico.

Quanto ao P3, o mesmo caracteriza-se pela influência antrópica advinda dos municípios de Santa Cruz do Sul e Vera Cruz, visto que está localizado na divisa entre essas cidades. O impacto de agroquímicos é teoricamente amenizado neste ponto, já que as propriedades rurais próximas são escassas, existindo apenas a carga de agrotóxicos originada em pontos anteriores e diluída ao longo do rio. Entretanto, esse ponto recebe a descarga de efluentes domésticos e industriais através de arroios urbanos que desembocam antes dele. Mesmo sabendo-se que a carga orgânica indicada pelo aumento de coliformes termotolerantes usualmente não está relacionada ao incremento da genotoxicidade (GRISOLIA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012), sabe-se que em alguns casos existe a possibilidade de efeitos genotóxicos, especialmente se a carga orgânica é apenas um marcador de efluentes tipo esgoto cloacal com o qual podem estar misturados outros tipos de substâncias domésticas e resíduos industriais, estes sim com potencial genotóxico, tais como metais pesados (SUNJOG *et al.*, 2012).

No estudo de Athanásio (2012), constatou-se aumento da frequência de aberrações cromossômicas em *A. cepa* expostos às amostras de quatro arroios urbanos de Santa Cruz do Sul que desembocam antes do P3. Além disso, as sementes de *A. cepa* expostas à água do arroio mais influenciado pela zona industrial do município apresentaram significativa redução do índice mitótico e aumento da frequência de micronúcleos, indicando potencial de geno e citotoxicidade nesse ponto.

Já o P4, está localizado após os municípios de Santa Cruz do Sul e Vera Cruz. Além da contaminação dos efluentes domésticos, acredita-se que os efluentes industriais advindos do Distrito Industrial de Santa Cruz do Sul constituam fonte importante de contaminantes que chegam ao Rio Pardinho através dos arroios urbanos que nele deságuam. Porém, também é importante destacar uma evidente contaminação por

atividades agrícolas. Na região podem ser observadas grandes áreas utilizadas para o cultivo de arroz irrigado. Sabe-se que esse cultivo requer o uso intenso de agroquímicos (Constantino, 2007), e o elevado valor de ID nesse ponto durante todo o ano (Tabela 1), mas principalmente na primavera (Figura 3) pode ter relação com essa atividade.

Segundo a Embrapa (2004) o ciclo de produção de arroz inicia-se na primavera estendendo-se até o final do verão, o que varia conforme as condições climáticas do local. Dessa forma, os agroquímicos utilizados para o cultivo de arroz irrigado podem afetar o P4 na primavera e no verão. Além disso, deve-se considerar que o verão de 2012 caracterizou-se por baixo índice pluviométrico, sendo 42% inferior à média histórica para a região, conforme dados obtidos da Central Meteorológica da UNISC. Assim, a escassez de chuvas pode ter contribuído para concentrar as substâncias genotóxicas que já estavam presentes no ambiente aquático. Cabe salientar que esse ponto é considerado pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler (FEPAM-RS) como área crítica de poluição ambiental, refletindo o grande impacto antropogênico sobre o local e conseqüentemente seu grande potencial genotóxico como demonstrado pelos resultados do EC.

Quanto à problemática dos agrotóxicos, os 4 pontos acompanhados neste estudo encontram-se em regiões onde o consumo desses produtos é de 15 a 20 mil kg por ano em cada região (ECOPLAN, 2005). Entre os pontos avaliados, os mais afetados por atividades de cunho agrícola são o P2 e o P4.

No P2, apenas no outono foi constatada diminuição significativa ($P < 0,0001$) no ID (Figura 3). Durante as outras estações, esse ponto destacou-se pelo elevado potencial genotóxico. Como já mencionado, esse fato pode estar relacionado ao cultivo do tabaco adjacente à área. No outono inicia-se a produção de mudas de fumo no sistema *float* (sistema de mudas em bandejas) (DA SILVA, 2011). Todos os agroquímicos utilizados durante essa fase permanecem nos canteiros, diminuindo a contaminação do ambiente (Schneider et al., 2009), o que pode ter influenciado a diminuição da genotoxicidade no P2 durante o outono.

O transplante das mudas inicia-se entre o fim do inverno e o início da primavera, sendo este o período em que mais produtos químicos, como inseticidas, herbicidas e outros, são aplicados nas lavouras, oferecendo grande risco de contaminação ao solo e recursos hídricos (DA SILVA, 2011). Assim, o aumento da genotoxicidade neste ponto durante as outras estações pode estar relacionado aos agroquímicos e/ou seus derivados que atingiram o leito do Rio Pardinho.

Quando comparados P3 e P4, P3 apresentou menor ID na maioria das estações do ano (Tabela 1). A genotoxicidade no P3 parece estar mais relacionada a efluentes domésticos e industriais, e no P4 à carga de agroquímicos. Isso porque os últimos dois pontos recebem contaminação de efluentes urbanos, mas ao P4 soma-se uma carga elevada de resíduos de agroquímicos provenientes das plantações de arroz irrigado que o margeiam, o que provavelmente explica o aumento do ID neste ponto.

Dessa forma, percebe-se o potencial genotóxico avaliado pelo Ensaio Cometa ao longo do Rio Pardinho pode estar relacionado principalmente com as atividades agrícolas, mais do que à própria urbanização. No estudo de Ghisi e Cestari (2012) a genotoxicidade do herbicida glifosato, produto muito utilizado em diversas culturas, inclusive na do tabaco, foi testada em peixes. Através dos resultados do Ensaio Cometa os autores encontraram elevado potencial genotóxico dessa substância em hepatócitos e células sanguíneas dos peixes expostos mesmo a baixas concentrações do herbicida.

Com isso, tem-se um fator preocupante: o último estudo que avaliou a presença de compostos químicos nas águas do Rio Pardinho foi realizado há cerca de 8 anos (ECOPLAN, 2005), e hoje as condições podem estar muito diferentes, estando piores ou não. Considerando o efeito cumulativo de algumas substâncias no ambiente, a presença de compostos ativos de agrotóxicos na água é de importância para a saúde pública.

Por conseguinte, sugere-se que em estudos de biomonitoramento aquático os parâmetros físico-químicos sejam utilizados para complementar os ensaios de toxicidade, mas que seja considerada a importância de utilizar outros tipos de ensaios, como os de genotoxicidade. Os ensaios de genotoxicidade são capazes de fornecer informações fidedignas sobre o impacto das atividades antrópicas nos seres vivos que habitam e/ou dependem dos corpos d'água, uma vez que detectam lesões moleculares, ou seja, no DNA de organismos expostos a concentrações baixas de toxinas, mesmo antes de esses organismos terem sua viabilidade e vitalidade afetadas.

Ainda, são importantes em situações onde, visualmente, o corpo hídrico parece ter água de boa qualidade, mas que na realidade recebem contaminantes tóxicos de alguma fonte. O P2 é um bom exemplo dessa situação. O elevado ID encontrado principalmente na coleta de verão é preocupante, já que as águas do Rio Pardinho nesse ponto são consideradas limpas devido à sua aparência e o local é utilizado pela população para atividades de lazer, como banho e pesca.

Quanto à espécie de peixe nativo *A. fasciatus* escolhida para ser utilizada neste trabalho, a mesma mostrou-se ser um bom organismo para o biomonitoramento da genotoxicidade no ambiente aquático. Seu comportamento reofílico é ideal para o objetivo do trabalho, pois esses animais normalmente não fazem grandes deslocamentos ao longo do rio (RAMSDORF, 2007), refletindo pontualmente as condições reais de cada local de coleta.

Dessa forma, o Ensaio Cometa em *A. fasciatus* mostrou-se de grande valia no biomonitoramento do Rio Pardinho. Através deste ensaio foi possível demonstrar a importância da avaliação de genotoxicidade na região, não só visando a qualidade dos ambientes aquáticos, mas também a saúde da população que desfruta de suas águas.

CONCLUSÕES

Os resultados do Ensaio Cometa sugerem a existência de contaminação nos 4 pontos do Rio Pardinho com variação de acordo com as diferentes estações. Como os pontos amostrados apresentam distintos efeitos antrópicos sugere-se que as principais fontes de contaminação relacionadas ao potencial genotóxico deste leito provavelmente são duas: a utilização de agrotóxicos no meio rural, afetando P1, P2 e P4; e o descarte de efluentes industriais nos arroios urbanos de Santa Cruz do Sul, que posteriormente deságuam no Rio Pardinho, e afetam principalmente P3 e P4. Em razão desses achados, sugere-se a avaliação da presença de compostos ativos de agrotóxicos em diferentes pontos do rio, assim como foi realizado em 2005. Além disso, a avaliação de metais pesados tanto nos arroios urbanos como nas águas do Rio Pardinho enriqueceria a análise. Esses dados, juntamente com análises físico-químicas, ensaios de toxicidade aguda e/ou crônica e testes de genotoxicidade, forneceriam um panorama muito mais completo da qualidade da água do Rio Pardinho e auxiliariam no desenvolvimento de uma estratégia para a sua recuperação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul pela concessão da Bolsa PIBIC-FAPERGS.

REFERÊNCIAS

ATHANÁSIO, Camila Gonçalves. **Monitoramento do potencial citotóxico e genotóxico de arroios urbanos do município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, utilizando *Allium cepa* como organismo teste.** 2012. 62 f. Trabalho de Conclusão (Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado), Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, jan. 2011.

COMITE PARDO. **Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo.** Santa Cruz do Sul, 2008. Disponível em: <<http://www.comitepardo.com.br/>>. Acesso em: 17 dez. 2013.

COMITÊ PARDO. **Sub-Programa 6: Uso do Solo – Microbacias.** 2013. Disponível em: <<http://www.comitepardo.com.br/noticias/2006-11-23/sub-programa6.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2013.

CONSELHO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO VALE DO RIO PARDO. **Plano Estratégico de desenvolvimento do Vale do Rio Pardo.** Santa Cruz do Sul: Edunisc, 1998. 140p.

CONSTANTINO, Larissa de Souza. **Avaliação do estresse oxidativo em *Geophagus brasiliensis*, expostos a agrotóxicos em culturas de arroz irrigado, no município de Araranguá, SC.** 2007. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

COSMANN, N. J.; DRUNKLER, D. A. Agrotóxicos utilizados nas culturas de milho e soja em Cascavel - PR. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v. 02, n. 06, 2012.

DA SILVA, Fernanda Rabaioli. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associada à suscetibilidade genética.** 2011. 171 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular – Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DA SILVA, J., HEUSER, V., ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: DA SILVA, J., ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 167-180.

ECOPLAN, Engenharia Ltda. **Consolidação do Conhecimento sobre os Recursos Hídricos da Bacia do Rio Pardo e Elaboração do Programa de Ações da Sub-Bacia do Rio Pardinho**. 2005. Disponível em:

<http://www.comiteparado.com.br/plano_pardo/relatorio_diagnostico/relatorio_sintese.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2013.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo**. 2004. Disponível em:

www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/circular tecnica/circ_67.pdf. Acesso em: 23 jun. 2012.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, n.1, p. 80-92, jan./fev. 2009.

GHISI, N. C.; CESTARI, M. M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. **Environ. Monit. Acess.**, v. 185, n. 4, apr. 2012.

GOETTEMS, Carlos Henrique. **Estudo de eficiência das estações de tratamento de efluentes de frigoríficos localizados na bacia hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil e da qualidade da água dos corpos receptores**. 2003. 135 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional – Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2003.

GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, A. B. B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 334-338, ago. 2005.

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

GROFF, A. A.; DA SILVA, J.; NUNES, E. A.; IANISTCKI, M.; GUECHEVA, T. N.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, C. P. F.; VAL, A. L.; HENRIQUES, J. A. P. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, n. 2, p. 93-99, mar. 2010.

HEEMANN, Fabiane. **O cultivo do fumo e condições de saúde e segurança dos trabalhadores rurais**. 2009. 171 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, abr. 2008.

LOBO, E. A., COSTA, A. B. da. Estudo da qualidade da água do Rio Pardinho, Município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, 1, p. 11-36, 1997.

MACHADO, Ediberto de Oliveira. **Desenvolvimento regional: avaliação da eficiência de detoxificação de efluentes químicos no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil utilizando bioensaios**. 2004. 100 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional - Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2004.

MORETTO, Daiane L. **Calibração do Índice de Qualidade da Água (IQA) para Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental, área de concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2011.

POLARD, T.; JEAN, S.; MERLINA, G.; LAPLANCHE, C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.1, p. 144-149, jan. 2011.

PRÁ, D., LAU, A. H., KNAKIEVICZ, T., CARNEIRO, F. R., ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. **Mutation Research**, v. 585, n. 1-2, p. 79-85, ago. 2005.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de Astyanax (Astyanax sp B e A. altiparanae) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**. 2007. 127 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética – Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RATHKE, Fabiana Silveira. **Avaliação da qualidade da água em propriedades de produtores de tabaco nos municípios de Gramado Xavier, Sinimbu e Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, utilizando bioensaios**. 2001. 256 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional - Mestrado e Doutorado) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2001.

RIBEIRO, M. F.; KÖHLER, A.; DÜPONT, A.; AZEVEDO, E. C. G. **Os peixes do Rio Pardinho**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2007.

RIBEIRO, M. F.; KÖHLER, A. Ictiofauna do Rio Pardinho. **Caderno de Pesquisa: Série Biologia**, v. 19, n. 2, p. 37-45, 2007.

SCHNEIDER, R. C. S.; TROLLI, B. V.; MAZUIM, M. S.; HAUCH, G.; BACCAR, N. M.; MACHADO, E. L. Photodegradation of pesticides in float system effluent from tobacco plantantion. **Latin American Applied Research**, v. 39, n. 4, p. 367-373, out. 2009.

SILVA, P. R. P.; BARBISAN, L. F.; DAGLI, M. L. Z.; SALDIVA, P. H. N. Sewage sludge does not induce genotoxicity and carcinogenesis. **Genetic and Molecular Biology**, v. 35, n. 3, p. 657-663, ago. 2012.

SUNJOG, K.; GACIC, Z.; KOLAREVIC, S.; VISNJIC-JEFTIC, Z.; JARIC, I.; KNEZEVIC-VUKCEVIC, J.; VUKOVIC-GACIC, B.; LENHARDT, M. Heavy metal accumulation and the genotoxicity in Barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube River pollution. **The Scientific World Journal**, v. 1, p. 1-6, abr. 2012.

WETZEL, A. P.; COSTA, A. B. da; LOBO, E. A. **Monitoramento da qualidade das águas da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil, utilizando variáveis físicas, químicas e microbiológicas**. Santa Cruz do Sul. 2008. Disponível em: <http://www.comitepardo.com.br/temp/apresentacao_comite_pardo_18-11-2008.ppt> Acesso em: 17 jul. 2012.

WETZEL, C. E.; LOBO, E. A.; OLIVEIRA, M. A.; BES, D.; HERMANY, G. Diatomáceas epilíticas relacionadas a fatores ambientais em diferentes trechos dos rios Pardo e Pardinho, Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil: Resultados preliminares. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 14, n. 2, p. 17-38, 2002.

ZENKNER, F. F.; SOARES, A. P. T.; PRÁ, D.; KOHLER, A.; RIEGER, A. Avaliação Genotoxicológica Em Peixes Nativos Do Rio Pardinho, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 23, n. 1, p. 5-16, 2011.