

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS DO *Hoplosternum littorale* DE
AMBIENTES AQUÁTICOS ANTROPIZADOS E NÃO ANTROPIZADOS
DE MANAUS, AM**

Bolsista: Francijara Araújo da Silva, CNPq

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0009/2010

**ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS DO *Hoplosternum littorale* DE
AMBIENTES AQUÁTICOS ANTROPIZADOS E NÃO ANTROPIZADOS
DE MANAUS, AM**

Bolsista: Francijara Araújo da Silva, CNPq
Orientadora: Prof^o Dra. Maria Claudia Gross, UFAM
Co-orientadora: Dra. Eliana Feldberg, INPA

MANAUS
2011

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Igarapés urbanos poluídos de Manaus, AM.....	2
Figura 2. Exemplar de <i>Hoplosternum littorale</i>	5
Figura 3. Células eritrocitárias de <i>Hoplosternum littorale</i> corada com Giemsa, onde a seta evidencia a presença de micronúcleo (aumento de 1000x).....	9

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência de micronúcleos encontrados em <i>Hoplosternum littorale</i> nos diferentes ambientes dos arredores de Manaus, AM.....	9
Tabela 2. Incidências de micronúcleos das comparações par a par dos ambientes amostrados	10

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 Locais de coleta e amostragem.....	6
2.2.Preparações das lâminas e análise dos micronúcleos	6
2.3 Análises estatísticas.....	7
4. RESULTADOS	9
5. DISCUSSÃO.....	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento exacerbado da industrialização e da urbanização ocorridos nas últimas décadas, os ecossistemas passaram a sofrer grandes impactos decorrentes destes processos. Em função do crescente aumento de resíduos químicos nos mananciais de Manaus, AM, principalmente relacionados a alterações provocadas por substâncias provenientes de efluentes industriais e domésticos, torna-se necessária a avaliação da possível ação genotóxica deste ambiente aquático em organismos que os habitam.

As atitudes comportamentais do homem, desde que ele se tornou parte dominante dos sistemas, têm mostrado tendência em sentido contrário à manutenção do equilíbrio ambiental. A poluição aquática passou a receber atenção quando foi possível perceber consequências adversas nestes ecossistemas e em seus organismos. A partir deste momento, surge um interesse global em relação às questões referentes à poluição aquática, embora ainda haja muitos países produzindo cargas enormes de poluição com fortes tendências de aumento (Shahidul Islam & Tanaka, 2004). Como o ambiente vem sofrendo severas interferências em decorrência dos resíduos das atividades humanas (Moraes, 2000), a biota aquática está constantemente exposta a grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente (Arias *et al.*, 2007), a sua saúde reflete a qualidade e a sustentabilidade do ecossistema aquático (Ramsdorf, 2007).

Essas atividades antropogênicas têm causado profundas alterações nas características químicas e físicas no meio ambiente aquático e, de uma forma geral, tais ecossistemas refletem todos os impactos gerados (Silva *et al.*, 2008). O lançamento de efluentes industriais em curso hídrico impõe significativo risco aos ecossistemas, devido principalmente à sua composição química, contendo, em alguns casos, toxinas, que pode ser genotóxicas (Vargas *et*

al., 2001). Como os organismos vivos estão em interação com o meio ambiente, o seu genoma fica exposto às interferências que esse meio sofre. A interação entre o meio e o organismo resulta em modificações que, quando positivas, refletem na adaptação do organismo quanto à melhor exploração desse meio, o que decorre também na própria modificação do ambiente pelo organismo (Minissi & Lombi, 1997; Pascalicchio, 2002).

Na região Amazônica, a contaminação dos igarapés urbanos está se tornando um dos problemas mais relevantes, sendo observado também na cidade de Manaus, capital do Amazonas. As precariedades das moradias nas margens desses igarapés, despejando parte do lixo e esgotos sanitários nessas águas (Figura 1), e o lançamento de despejos de origem industrial provocam impactos ambientais, verificados através das condições físico-químicas destas águas, que se apresentam com baixos teores de oxigênio dissolvido e altas concentrações de ferro, manganês, zinco, cobre e nitrato, além da presença de coliformes fecais e totais acima das faixas permissíveis para recreação e consumo humano e doméstico (Silva, 1996; Elias & Silva, 2001).



Figura 1 – Igarapés urbanos poluídos de Manaus, AM

Fonte: Retirado de < <http://www.acritica.com.br/Fotos/noticiaro>>

A contaminação dos ambientes pode constituir um risco devido ao potencial genotóxico, o qual muitas vezes apresenta efeito cumulativo nos organismos e torna-se cada vez mais danoso quando inserido em uma cadeia alimentar (Ribeiro *et al.*, 2003).

Estes efeitos genotóxicos são caracterizados pela capacidade de um agente promover alterações no DNA de uma célula através de modificações químicas no DNA, as quais podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Ainda, elas podem causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômenos estes que podem levar ao desenvolvimento do processo canceroso e morte celular. A detecção dos efeitos destas alterações nos organismos é importante nos estudos do impacto que eles podem trazer para as populações animal, vegetal e principalmente, humana (Costa & Menk, 2000; Fernandes, 2005).

Testes biológicos para genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação de reações de organismos vivos à poluição ambiental complexa e para uma indicação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes, enquanto análises físico-químicas identificam a presença e as respectivas concentrações de diferentes poluentes (Moraes, 2000).

Uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias xenobióticas nos organismos é o Teste do Micronúcleo (MN), inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (Schmid, 1976; Pantaleão *et al.*, 2006). Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, empregando peixes como indicadores ambientais para avaliar a qualidade de recursos hídricos e os efeitos da poluição sobre esses organismos (Bucker *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2007) principalmente por sua capacidade de avaliar qualitativamente a ação de agentes clastogênicos, que provocam a quebra de cromossomos e de agentes aneugênicos, que causam a segregação cromossômica anormal, sendo um método eficaz para rastrear químicos mutagênicos (Al-Sabti, 1991; Fenech, 2000; Ribeiro *et al.*, 2003).

Diferentes espécies têm se mostrado bastante eficientes como bioindicadores do comprometimento ambiental, por serem capazes de detectar, por meio de processos bioquímicos específicos, os efeitos sinérgicos de mistura de contaminantes presentes no ambiente (Benincá, 2006; Ramsdorf, 2007). Neste contexto, os peixes receberam uma atenção especial como um possível monitor de ambientes poluídos, uma vez que são capazes de metabolizar xenobióticos e poluentes acumulados no meio aquático (De Flora *et al.*, 1993; Matsumoto *et al.*, 2006; Vanzella *et al.*, 2007; Moron *et al.*, 2006; Ramsdorf, 2007). Além disso, os peixes desempenham funções diferentes na cadeia trófica e são capazes de bioacumular de forma direta, contaminantes dissolvidos na água (Lopes-Poleza, 2004; Souza & Fontanetti, 2007).

Tendo em vista o crescente aumento de resíduos químicos nos mananciais de água de Manaus, AM, por resíduos urbanos (esgotos) e industriais, torna-se necessária a avaliação da possível ação genotóxica deste ambiente aquático. Porém, poucas são as espécies de peixes que conseguem sobreviver nos igarapés urbanos poluídos e nos diferentes tipos de águas amazônicas, as quais apresentam características físico-químicas distintas. Interessantemente, os tamoatás (Figura 2) (*Hoplosternum littorale*, Siluriformes, Callichthyidae), mostram-se adaptados às algumas condições naturais dos rios que compõe a bacia local (águas brancas e misturadas) e aos igarapés urbanos que sofrem com a grande eutrofização humana. Ainda, estes peixes são bastante consumidos pela população ribeirinha como fonte de proteína, tornando-se indispensável avaliar se está ocorrendo algum tipo de alteração do material genético desta espécie, a qual poderia estar relacionada à bioacumulação de algum composto, o que seria nocivo quando considerada a cadeia alimentar total. Para tanto, torna-se fundamental verificar se existe diferença na incidência de micronúcleos entre os tamoatás provenientes do lago Catalão (água misturada) e Marchantaria (água branca), considerados não-poluídos; entre tamoatás provenientes de igarapés urbanos de Manaus-AM, submetidos à

poluição por efluentes domésticos (igarapé do Mindu) e despejos de origem industrial (igarapé do Quarenta) e entre os tamoatás provenientes de ambientes poluídos (igarapés do Mindu e do Quarenta) e não poluídos dos arredores de Manaus-AM.



Figura 2 – Exemplar de *Hoplosternum littorale*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de coleta e amostragem

Foram coletados 72 indivíduos provenientes de ambientes poluídos e ambientes não poluídos de Manaus, AM (Licença do IBAMA número 011/2005). Sendo 40 exemplares de *Hoplosternum littorale* dos igarapés do Mindu (25 indivíduos) e do Quarenta (15 indivíduos), que formam as micro-bacias do São Raimundo e Educandos, respectivamente, apontados como pontos mais críticos de poluição ambiental em Manaus, AM (Pinto *et al.*, 2009). E para a análise de ambiente considerado não antropizado, 16 exemplares foram coletados do lago da Marchantaria (água branca) e 16 do lago Catalão, localizado na confluência do rio Negro e Solimões (água misturada, com características físico-químicas de água preta). Estes últimos ambientes foram escolhidos por apresentarem um grande volume de água, o que contribui para não apresentarem poluentes químicos detectáveis (Pinto *et al.*, 2009).

Estas coletas foram realizadas utilizando redes de pesca e rapichés. E logo em seguida, os exemplares coletados foram acondicionados em recipientes contendo a água do próprio ambiente onde foram capturados e encaminhados vivos ao Laboratório de Citogenômica Animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram realizados todos os procedimentos necessários e as análises dos esfregaços sanguíneos de cada indivíduo.

2.2 Preparações das lâminas e análise dos micronúcleos

O sangue dos 72 indivíduos, sendo 40 provenientes de ambientes poluídos e 32 de ambientes não poluídos, foi coletado com o auxílio de seringa com agulha, utilizando anticoagulante para o ensaio de micronúcleo. Logo após, foram preparadas duas lâminas por indivíduo. Para tanto, uma gota de sangue de cada indivíduo foi distendida sobre uma lâmina

limpa, com o auxílio de outra lâmina. Após sua secagem, em torno de 12 horas, as lâminas foram fixadas em etanol PA (100%) por 30 minutos, secas ao ar e posteriormente coradas com Giemsa 5 % (diluído em tampão fosfato pH 6,8) por 10 minutos, sendo lavadas posteriormente com água destilada e secadas ao ar, em temperatura ambiente. Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico para contagem dos micronúcleos presentes, em resolução 1000x, sendo efetuada a contagem de 1000 eritrócitos por lâmina e anotação do número de micronúcleos nestas células (Bucker *et al.*, 2006). Os micronúcleos foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech *et al.* (2003) e Freita *et al.* (2005), sendo as principais características: diâmetro do micronúcleo até 1/3 do diâmetro total do núcleo principal deve ser menor; micronúcleo não estar conectado e nem ligados ao núcleo principal e permanecer no citoplasma; ter formato redondo e apresentar envoltório visivelmente separado da membrana nuclear possuindo a mesma intensidade de coloração do núcleo principal.

2.3 Análises estatísticas

O valor total de micronúcleos encontrados nos *Hoplosternum littorale* coletados nos diferentes ambientes foram comparados par a par, em diferentes combinações, pelo teste-t bicaudal com número de amostras diferentes, com nível de significância de 5%:

- a) Lago Catalão x lago da Marchantaria para avaliar se existe diferença estatística relacionada a diferentes tipos naturais de águas amazônicas.
- b) Igarapé do Mindu (micro-bacia do São Raimundo) x igarapé do Quarenta (micro-bacia do Educandos) para avaliar se existe diferença estatística relacionada a diferentes tipos de poluição.

c) Ambiente poluído (igarapés do Mindu e do Quarenta) x ambiente considerado não poluído (lago Catalão e da Marchantaria) para avaliar se existe diferença estatística relacionada a ambientes eutrofizados e naturais.

3. RESULTADOS

Na tabela 1 são apresentadas as incidências de micronúcleos (Figura 3) encontrados em *Hoplosternum littorale* (tamoatás) dos diferentes ambientes, tanto com poluição quanto sem poluição. Em média foram encontrados 2,84 micronúcleos por indivíduo do igarapé do Mindu; 3,33 do igarapé do Quarenta; 2,68 do lago Catalão e 2,62 do lago da Marchantaria, totalizando em média 3,025 micronúcleos em indivíduos provenientes do ambiente poluído e 2,656 micronúcleos por indivíduo proveniente do ambiente não poluído.

Tabela 1 – Incidência de micronúcleos encontrados em *Hoplosternum littorale* nos diferentes ambientes dos arredores de Manaus, AM.

Local	Numero de indivíduos	Total de micronúcleos	Número médio de micronúcleos por indivíduo
Igarapé do Mindu	25	71	2,84
Igarapé do Quarenta	15	50	3,33
Lago Catalão	16	43	2,68
Lago da Marchantaria	16	42	2,62

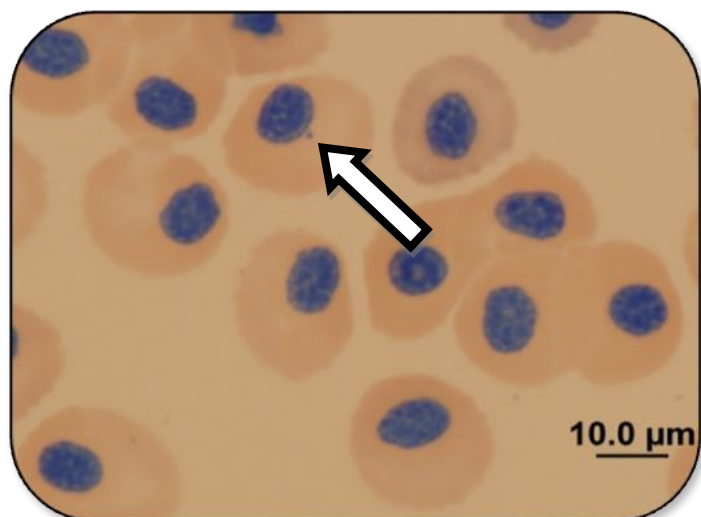


Figura 3 - Células eritrocitárias de *Hoplosternum littorale* corada com Giemsa, onde a seta evidencia a presença de micronúcleo (aumento de 1000x)

Teste *t* não revelou diferenças estatísticas significativas na incidência de micronúcleos entre os tamoatás provenientes dos diferentes tipos de águas amazônicas (lago Catalão = água misturada x lago da Marchantaria = água branca; $p=0,923$), igarapés urbanos de Manaus submetidos a diferentes tipos de poluição (igarapé do Mindu = efluentes domésticos x igarapé do Quarenta = efluentes industrial; $p=0,431$) e entre ambiente poluído (igarapés urbanos) e ambientes naturais (lagos Catalão e da Marchantaria) ($p=0,409$). Para verificar qual ambiente foi responsável pela diminuição dos valores de *p* nas análises comparativas entre os ambientes submetidos aos diferentes tipos de poluição e entre ambiente poluído e não poluído, análises par a par foram efetuadas e revelaram que sempre que o igarapé do Quarenta entra na análise são visualizados os valores de mais baixos de *p*, apesar de nenhum valor ser significativo (tabela 2).

Tabelas 2 – Incidências de micronúcleos das comparações par a par dos ambientes amostrados.

Combinações par a par	Teste <i>t</i> ($p<0.05$)
Lago Catalão x Lago da Marchantaria	$p= 0, 923$
Igarapé do Mindu x Igarapé do Quarenta	$p= 0, 431$

Ambiente poluído x ambiente sem poluição	p= 0, 409
Lago Catalão x Igarapé do Quarenta	p= 0, 352
Lago Catalão x Igarapé do Mindu	p= 0, 806
Lago da Marchantaria x Igarapé do Quarenta	p= 0, 286
Lago da Marchantaria x Igarapé do Mindu	p= 0, 710

4. DISCUSSÃO

A bacia amazônica é constituída por um complexo sistema de drenagem formado por cerca de sete mil tributários que deságuam no Solimões-Amazonas e formam um complexo sistema caracterizado por águas claras, pretas e brancas (Sioli, 1990; Santos & Ferreira, 1999; Goulding *et al.*, 2003). Além desta diversidade natural de ambientes, muitos dos igarapés urbanos de Manaus vêm sofrendo interferências antrópicas, sendo que este despejo de dejetos já ocasionou mudanças nas características físico-químicas destes corpos de água (Silva, 1996; 1999; Melo *et al.*, 2005; Santana & Barroncas, 2007).

Segundo Silva (1996) os valores de temperatura das águas variam de 28,0 a 33,0° C no igarapé do Quarenta e 26,0 a 29,3° C no igarapé do Mindu, estando relacionados à falta da mata ciliar, oxidação biológica da matéria orgânica e lançamento de despejos industrial e doméstico. Além disso, Sioli (1990) evidenciou variação no aumento de pH, altas condutividades, baixos teores de oxigênio dissolvido, e altas concentrações de cátions e ânions nas águas destes igarapés, sendo que no igarapé do Quarenta os valores são maiores quando comparados com o igarapé do Mindu. Isto indica que as alterações nestes ecossistemas estão relacionadas às origens das fontes de poluição: nos igarapés da Bacia

hidrográfica São Raimundo, a contaminação é predominantemente causada por resíduos domiciliares e na sub-bacia hidrográfica do Educandos existem emissões de efluentes industriais e domiciliares, uma vez que seu principal tributário, o Quarenta, atravessa o Distrito Industrial de Manaus.

Tendo em vista que a biota reage a estímulos naturais ou antropogênicos, inúmeros são os testes que estão sendo aplicados para efetuar a comparação de espécies que conseguem viver em diferentes ambiente e para efetuar uma avaliação genotóxica destes ambientes antropizados. Nos últimos anos, muitos ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar a genotoxicidade de poluentes lançados no ambiente, tais como estudos ecológicos, toxicológicos e químicos, avaliando a poluição por metais pesados e contaminantes orgânicos; avaliação de genotoxicidade em ambientes aquáticos sob a influência de metais pesados e contaminantes orgânicos (Mengchang *et al.*, 1998; Rashed, 2001; Vargas *et al.*, 2001). Em estudos realizados na bacia Amazônica o micronúcleo foi utilizado para avaliação mutagênica de altas concentrações de mercúrio encontradas no rio Madeira devido a atividades relacionada ao garimpo, examinando-se três espécies comercialmente importantes da região (*Prochilodus nigricans*, Curimatã; *Mylossoma duriventris*, Pacu branco; e *Hoplias malabaricus*, Traíra) (Porto *et al.*, 2005).

Contudo, análises genotóxicas *in loco* não foram efetuadas nas proximidades de Manaus, considerando os diferentes tipos naturais de água e os ambientes poluídos. Nos entornos de Manaus são encontradas águas pretas, brancas e a mistura destes dois tipos de águas em grandes rios, que não apresentam poluentes químicos detectáveis (Pinto *et al.*, 2009). Como os tamoatás podem ser encontrados tanto nas águas brancas quanto nas misturadas a análise comparativa da incidência de micronúcleos provenientes destes dois ambientes foi efetuada e não revelou diferença significativa entre eles ($p=0,923$). Deste modo, foi possível considerar os lagos Catalão e da Marchantaria como um grupo único não

poluído. Com relação aos igarapés urbanos de Manaus, apesar da origem da poluição ser diferente, não houve diferença significativa na incidência de micronúcleos quando considerado os igarapés do Quarenta e Mindu ($p=0,431$), também sendo possível considerar estes igarapés como um grupo único poluído. Ainda, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de indivíduos provenientes de ambientes poluídos e não poluídos de Manaus, AM, contudo ficou evidente que quando os indivíduos do igarapé do Quarenta eram inseridos na análise, os menores valores de p foram encontrados, apesar de nenhum valor ser significativo.

Estes resultados indicam que os poluentes antropogênicos e as diferenças físico-químicas encontradas naturalmente nos ambientes amazônicos parecem não interferir gravemente nos processos de replicação do DNA e divisões celulares dos tamoatás, estando à adaptabilidade destes peixes aos diferentes ambientes baseada em uma estabilidade estrutural do material genético. Esta estabilidade também foi evidenciada em tamoatás expostos experimentalmente ao sulfato de cobre 5×10^{-5} M por 24h, não havendo aumento da incidência de micronúcleos nestes indivíduos (Rocha *et al.*, 2010). Deste modo, os tamoatás não podem ser considerados bons modelos para avaliação de alterações ambientais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Sabti, R. 1991. *Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes*. Joseph Stephan Institute, p 5-39.
- Arias, A.R.L.; Buss, D.F.; Albuquerque, C.; Inácio, A.F.; Freire, M.M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D.F. 2007. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. *Ciências Saúde Coletiva*, 12(1): 61-72.
- Benincá, C. 2006. Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho - Jaguaruna (SC) e Santa Marta-Laguna (SC), utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 112 p.
- Bücker, A.; Carvalho, W.; Alves-Gomes, J.A. 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*, 36(3): 357- 364.
- Costa, R.M.A.; Menk, C.F.M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 12: 24-26.
- De Flora, S.; Vigário, I.; D'agostini, E.; Camoirano, A.; Bagnasco, M.; Bennicelli, C.; Melodia, F.; Arillo, A. 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water. *Mutation Research*, 319:167-177.
- Elias, A.S.S.; Silva, M.S.R. 2001. Hidroquímica das águas e quantificação de metais pesados nos sedimentos das bacias hidrográficas de área urbana de Manaus, que deságuam no rio Negro. In: *X Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA*, Manaus, p 402-405.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 445: 81-95.
- Fenech, M.; Cheng, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.
- Fernandes, T.C.C. 2005. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. 2005. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 212p.
- Freita, V.S.; Lopes, M.A.; Meireles, J.R.C.; Reis, L.; Cerqueira, E.M.M. 2005. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 29(2):189-199.

Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. The Negro and the Trombetas – Black and Clear Waters from Ancient Lands. *In: The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 98p.

Lopes-Poleza, S. D. C. 2004. Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH₃Hg⁺) em *Hoplias malabaricu* através da frequência de aberrações cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 70p.

Matsumoto, S.T.; Mantovani, M.S.; Malagutti, M.I.A.; Dias, A.L.; Fonseca, I.C.; Marin-Morales, M.A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (1): 148-158.

Melo, E.G.F.; Silva, M.S.R.; Miranda, S.A.F. 2005. Influência antrópica sobre águas de igarapés de Manaus-Amazonas. *Caminhos de Geografia* 5(16):40-47.

Mengchang, H.E.; Zijilan, W.; Hongxião, T. 1998. The chemical, toxicological and ecological studies in assessing the heavy metal pollution in Le An river, China. *Water Research*, 32(2): 510-518.

Minissi, S.; Lombi, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research*, 39:317-321.

Moraes, D.S.L. 2000. Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 158p.

Pantaleão, S. M.; Alcântara, A.V.; Alves, J.P.H.; Spanó, M.A. 2006. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japarutuba River in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47 (3): 219-224.

Pascalichio, A.E. 2002. Contaminação por metais pesados. *Ed. Annablume*, São Paulo, 132p.

Pinto, A.G.N.; Horbe, A.M.C.; Silva, M.S.R.; Miranda, A.F.; Pascoalato, D.; Santos, H.M.C. 2009. Efeitos da ação antrópica sobre a hidrogeoquímica do rio Negro na orla de Manaus, AM. *Acta Amazonica*, 39(3): 627-638.

Porto, J.I.R.; Araújo, C.S.O.; Feldberg, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, 97: 287-292.

Ramsdorf, W. 2007. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e *A. altiparana*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri- UFPR). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 127p.

Rashed, M.N. 2001. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser lake. *Environment International*, 27: 27-33.

Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA. Canoas-RS, 356p.

Rocha, C.A.M.; Cunha, L.A.; Almeida, A.; Pereira, L.C.; Silva, M.H.V. 2010. Avaliação do efeito genotóxico do sulfato de cobre em *Hoplosternum litoralle* (Siluriformes: Callichthyidae) através do teste do micronúcleo písceo. *Cadernos Temáticos/ Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica* 45-50.

Santana, G.P.; Barroncas, P.S.R. 2007. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na Bacia do Tarumã-Açu Manaus – (AM). *Acta Amazonica*, 37(1): 111-118.

Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da bacia Amazônica. In: Lowe-McConnel, R. H. (Ed.). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo, EDUSP, p 345-375.

Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Hollaender, A (Ed.) *Principles and Methods for Their Detection*. Plenum Press, New York, p.31-53.

Shahidul Islam, M.; Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 624-649.

Silva, M. R.S. 1996. Metais pesados em sedimentos de fundo de igarapés (Manaus-AM). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, 120p.

Silva, M.L. 1999. Hidroquímica elementar e dos isótopos de urânio nos aquíferos de Manaus – AM. Tese de doutorado, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 135p.

Silva, G.; Canova, T.; Guimarães, A.T.B.; Adam, M. 2008. Influência sazonal sobre a frequência de micronúcleos e edemas branquiais em *Scleromistax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae) coletados em rios da serra do mar - PR, Brasil. *RUBS*, 1(3): 84-90.

Sioli, H. 1990. Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. Editora Vozes, Rio de Janeiro, 72p.

Souza, T. S.; Fontanetti, C. S. 2007. Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo. In: *Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás*, Campinas.

Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction ou a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631, 36-43.

Vargas, V.M.F.; Migliavacca, S.B.; Melo, A.C.; Horn R.C.; Guidobono, R.R.; Ferreira, I.C.F.S.; Pestana M.H.D. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, 490:141-158.