



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - MODALIDADE LICENCIATURA

ANA CLEIDE RAMOS

**ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E GENOTÓXICAS EM UM RIO TROPICAL  
(BRASIL) SOB A INFLUÊNCIA DA AÇÃO ANTROPOGÊNICA**

**Picos**

**Julho/2016**

ANA CLEIDE RAMOS

**ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E GENOTÓXICAS EM UM RIO TROPICAL  
(BRASIL) SOB A INFLUÊNCIA DA AÇÃO ANTROPOGÊNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do Grau de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

**Picos**

**Julho/2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

**Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí**

**Biblioteca José Albano de Macêdo**

**R175a** Ramos, Ana Cleide

Análises físicas, químicas e genotóxicas em rio tropical (Brasil) sobre a influência da ação antropogênica / Ana Cleide Ramos– 2017.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (55f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2017.

Orientador(A): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa.

1. Poluição Aquática. 2. Ecotoxicologia 3. Genotoxicidade em Ecossistemas. I. Título.

**CDD 577.6**

**ANA CLEIDE RAMOS**

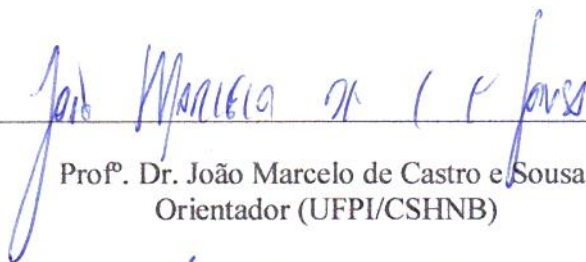
**ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E GENOTÓXICAS EM UM RIO TROPICAL  
(BRASIL) SOB A INFLUÊNCIA DA AÇÃO ANTROPOGÊNICA**

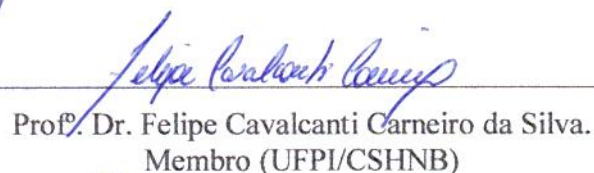
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do Grau de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

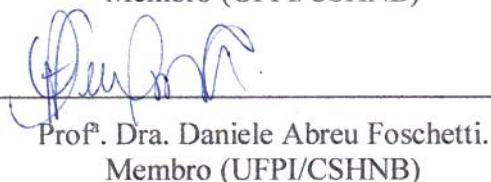
Orientador(a): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

Aprovado em 28 / 07 / 2016

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa.  
Orientador (UFPI/CSHNB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva.  
Membro (UFPI/CSHNB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Daniele Abreu Foschetti.  
Membro (UFPI/CSHNB)

Às duas pessoas mais importantes da minha vida, meus queridos e maravilhosos pais, Maria das Graças e Francisco das Chagas, com todo o carinho e imensurável gratidão, dedico-lhes esse trabalho de valor inestimável em minha jornada profissional!

## AGRADECIMENTOS

Saber agradecer é uma atitude de reconhecimento e carinho por todos aqueles que de alguma maneira contribuíram à realização desta obra. É saber a importância de como, cada um, a sua maneira, contribuiu com este trabalho.

A Deus, por ter me feito uma pessoa vitoriosa, por ter permitido que eu chegasse aqui.

Aos meus pais, Francisco das Chagas e Maria das Graças, muito obrigada, pelo amor e pela educação.

Aos meus irmãos Francisco Filho, Claudiana Ramos e Ana Claudia muito obrigada pela motivação para a realização dos meus sonhos e ao meu namorado Afonso Carvalho, pelo carinho, apoio, paciência e amor dado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Dr. João Marcelo de Castro e Sousa por ter acreditado em mim, pelo exemplo de profissionalismo e por ter dividido seu conhecimento com paciência e boa vontade estando sempre disponível a contribuir com minha aprendizagem.

Aos meus grandes amigos e companheiros de sala em especial ao Francisco Antônio que tanto me ajudou, a Mércia Moura, o Erick Leal e a Hélia de Alencar que estiveram presentes nessa grande jornada, sempre se disponibilizando a contribuir para esta realização, meu muito obrigado.

A todos os meus familiares que me ajudaram nessa jornada tão importante.

A todos os meus professores que conseguiram deixar marcas significativas em meu processo formativo em especial a professora Patrícia Gonzaga, Artur Henrique, Maria Carolina, Ana Paula Peron, Laísa Castro, Paulo Víctor e Suzana Lopes.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima.” (Louis Pasteur).

## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
1.1 Ecotoxicologia e Biomonitoramento Ambiental.....	8
1.1.1 Biodegradação e Bioacumulação.....	8
1.1.2 Mutagênese Ambiental, Técnicas citogenéticas e Organismos-testes.....	10
1.2 Bacia hidrográfica do rio Guaribas.....	12
1.2.1 Localização do rio Guaribas e da região estudada.....	12
1.2.2 Importância do rio Guaribas e caracterização dos problemas antropogênicos.....	13
<b>2 DESENVOLVIMENTO (ANEXAÇÃO DO ARTIGO).....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Área de estudo e pontos de coleta.....	19
2.2.2 Análises físicas e químicas da água.....	21
2.2.3 Bioensaio com <i>Oreochromis niloticus</i> .....	21
2.2.4 Ensaio Cometa.....	22
2.2.5 Análise Estatística.....	23
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
3.1 Caracterização Físico-química e a Qualidade da água.....	23
3.2 Ensaio Cometa.....	30
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>43</b>



## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Ecotoxicologia e Biomonitoramento Ambiental

#### 1.1.1 Biodegradação e Bioacumulação

A biodegradação e a bioacumulação são conceitos de fundamental importância dentro da ecotoxicologia, parte da toxicologia que permite analisar o impacto potencialmente deletério de poluentes ambientais sobre os organismos vivos causados pelas atividades antrópicas (HINTON, 2005; NETA et al., 2014; SHARMA et al., 2015).

A biodegradação é a decomposição de materiais e substâncias orgânicas, pela ação de organismos vivos, normalmente microscópicos e, em especial as bactérias. Algumas dessas substâncias se alteram mais rapidamente e de forma mais completa que outras. A biodegradação completa resulta em um composto que é convertido em água e dióxido de carbono. Algumas substâncias podem se degradar em moléculas intermediárias menores. Essa é denominada degradação primária. Essas moléculas são intermediárias no processo final de biodegradação. Entretanto, em alguns casos, elas podem ser mais persistentes ou mais tóxicas que o poluente inicial. Este processo pode se proceder sob condições aeróbicas (com oxigênio) e/ou anaeróbicas (sem oxigênio) (BARBOSA et al., 2010; ERBE et al., 2011; NUNES et al., 2011).

A partir dos produtos gerados pela biodegradação pode ocorrer a bioacumulação, que é o acúmulo de qualquer produto químico nas células de um organismo vivo, em concentrações mais elevadas do que as encontradas no seu meio. Esta bioacumulação pode ser de forma direta através do ambiente em que vivem (bioconcentração) e indiretamente a partir da ingestão de alimentos (biomagnificação). O volume de bioacumulação depende do equilíbrio entre a taxa pela qual a substância penetra nas células do organismo e a velocidade com a qual ela é degenerada ou expelida do corpo. Se um organismo ingerir uma pequena quantidade de poluente, ele pode ser capaz de eliminá-lo sem acúmulo significativo. Entretanto, se o organismo for incapaz de eliminar o contaminante de seu corpo, haverá bioacumulação (HINTON, 2005; MASOOD et al 2013; MAGDEBURG et al., 2014).

De forma alternativa, quando um ambiente estiver severamente contaminado, um organismo poderá absorver uma quantidade maior da substância que aquela que ele

pode excretar. Haverá bioacumulação, a não ser que se reduza a concentração do contaminante. À medida que se sobe no nível trófico maior será a quantidade de químicos acumulados no ser vivo, verifica-se que nos animais predadores os valores de concentração são mais elevados que nos animais que estes se alimentam (KANG et al., 2011; NETO et al, 2013).

Na relação entre substâncias químicas e efeito biológico, numerosos fatores são importantes, como as propriedades da molécula, a concentração, a via de exposição, o comportamento e o destino dos compostos, etc. Uma vez liberada, uma substância química pode entrar na atmosfera, na litosfera, na hidrosfera ou na biosfera por diferentes mecanismos, por exemplo, estando na água e permanecer na forma de partículas no sedimento e sendo absorvido pela biosfera (organismos vivos). A disponibilidade de um toxicante a um organismo em um ambiente depende da quantidade liberada no ambiente, da quantidade que desapareceu nos depósitos e de fatores de dispersão, transporte e bioacumulação (AZEVEDO e CHASIN, 2004; TOBISZEWSKI et al., 2010).

É importante considerar que o compartimento biótico é o destino final dos contaminantes, sendo onde ocorrem os efeitos tóxicos e genotóxicos. Na transferência de contaminantes do meio externo para um organismo, as concentrações observadas podem ser muito superiores às do meio. Vários fatores influenciam a bioacumulação, como processos biológicos envolvendo ecologia alimentar, hábitos, fisiologia e bioquímica das espécies e composição de compostos químicos no ambiente (AZEVEDO e CHASIN, 2004; HU et al., 2011).

Os testes de toxicidade são utilizados para prever o impacto de um poluente no meio ambiente. Os resultados desses experimentos são utilizados para calcular a quantidade máxima de material que pode ser descarregada sem um efeito tóxico direto no meio ambiente. O tipo exato de teste realizado depende da legislação local e do provável destino do contaminante, ou seja a análise do ambiente e da sua fauna e flora são importantes para montar um plano de biomonitoramento: Por exemplo, se o ambiente em estudo possuir peixes eles fornecerão uma estimativa dos contaminantes presentes na coluna para análise de metais pesados que tendem a acumular no sedimento. (FALFUSHYNSKA et al. 2010).

### 1.1.2 Mutagênese Ambiental, Técnicas Citogenéticas e Organismos-testes

A poluição do ambiente por produtos genotóxicos e mutagênicos afetam o próprio organismo e as suas gerações futuras, sendo observada não apenas para o homem, como também para as plantas, os animais e os microrganismos. O estudo detalhado, minucioso e ordenado para detectar o modo de ação e os meios de prevenção do incremento de mutações, devido a causas antrópicas, deve, portanto, merecer uma atenção bastante especial por parte, principalmente, da comunidade científica (RIBEIRO et al., 2003).

Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de se avaliar o comportamento, as transformações e os efeitos de agentes químicos, físicos ou biológicos, tanto no ambiente como nos organismos. Os agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações na molécula de DNA. Essas alterações podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células, mas, quando não reparadas ou reparadas erroneamente, originam mutações gênicas e cromossômicas (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

Mutações gênicas referem-se às mudanças de um ou poucos nucleotídeos do polímero de DNA, por deleções, duplicações e/ou alterações de pares de bases, que acabam modificando o funcionamento de um gene. Já nas mutações cromossômicas, há uma reorganização na estrutura do DNA por translocação, inversão, deleção, duplicação, fusão e fissão dos cromossomos, alterando o complemento cromossômico em estrutura e/ou número (PAVLICA et al., 2000; ERGENE et al. 2007). Sabe-se que muitos destes compostos podem causar mudanças prejudiciais, no material genético, sem que se expressem de imediato e, quando lançados no ambiente, podem representar um risco para a saúde do homem, em virtude do seu potencial para induzir mutações (ERDTMANN, 2003; KLAUCK et al. 2013).

Testes citogenéticos são adequados para identificar os efeitos perigosos de substâncias, em suas diversas concentrações, e em diferentes tempos de exposição. Estes testes, realizados geralmente em organismos-teste, são comumente aplicados no biomonitoramento da extensão da poluição e na avaliação dos efeitos combinados de substâncias tóxicas e mutagênicas, sobre os organismos no ambiente natural (MORAES, 2000).

Muitas técnicas, tais como a análise de aberrações cromossômicas, ensaio do cometa; teste do micronúcleo; quantificação dos adutos de DNA; análise das características morfológicas nucleolares estão sendo desenvolvidas, por muitos autores, para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de agentes poluidores (MATSUMOTO et al., 2005). Dependendo da mutação a ser investigada e do tipo de material a ser avaliado, é realizada a escolha do organismo e do teste mais adequado para o estudo (MATSUMOTO, 2003). Os efeitos de muitos poluentes podem ser examinados diretamente em vários organismos, normalmente através da análise de células, tecidos ou órgãos, mediante a utilização de biomarcadores (EISSA et al., 2009; CAZENAVE et al. 2009).

Muitos vegetais têm sido considerados excelentes organismos indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas. Atividades mutagênicas de químicos podem ser analisadas em diferentes sistemas testes vegetais como em *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare*. Desta forma, ensaios com este grupo de organismo são úteis para se testar amostras ambientais complexas como esgoto, águas de rios e solos contaminados (LEME e MARIM-MORALLES, 2009).

Outro organismo teste bastante utilizado para o monitoramento de poluentes ambientais são os peixes. Segundo Tsangaris et al. (2011), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o potencial de perigo de substâncias químicas ou para a evidência da poluição ambiental. Peixes acumulam poluentes diretamente de águas contaminadas ou pela ingestão de organismos contaminados, uma vez que desempenham diferentes papéis na cadeia trófica, sendo capazes de bioacumular, de forma direta, contaminantes dissolvidos na água, caracterizando uma via indireta de contaminação (ATTEQ et al., 2002).

A possibilidade dos peixes serem mantidos em laboratório e facilmente expostos às substâncias tóxicas, permite a utilização destes organismos na avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (DUARTE et al., 2012; VANZELLA et al., 2007).

## 1.2 Bacia Hidrográfica do rio Guaribas

### 1.2.1 Localização do rio Guaribas e da região estudada

A Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos classificou onze bacias hidrográficas piauienses, dentre elas está a bacia hidrográfica do rio Guaribas, situada na Mesorregião Sudeste piauiense, entre os paralelos 6°30' e 7°24' de latitude sul e entre os Meridianos 40°18' e 41°48' de longitude a oeste Greenwich, a bacia do Guaribas possui 8.415 km<sup>2</sup>, correspondendo a aproximadamente 3,35% da área total do Estado (FILHO e GOMES, 2004).

O rio Guaribas nasce na Serra das Almas em Pio IX-PI, a 600 m de altitude. Pela margem direita possui os afluentes Cana Brava e Pitombeiras, e pela margem esquerda os afluentes Grotão, Riachão e São João. A bacia do rio Guaribas envolve os municípios de Bocaina, Sussuapara, Picos, Pio IX, Monsenhor Hipólito, Alagoinha, Francisco Santos, Santo Antônio de Lisboa, São José do Piauí, São Julião, Dom Expedito Lopes, Santa Cruz do Piauí, Gaturiano, Santana, Belém do Piauí, Jaicós e Fronteiras. A literatura considera o Rio Guaribas como um dos importantes afluentes da margem direita do médio curso do rio Itaim e o rio Riachão como o maior afluente do Guaribas que, por sua vez, é afluente do Parnaíba, o maior rio piauiense (SANTOS et al, 2012).

O município de Picos localiza-se na região Centro/Sul do Estado do Piauí, com uma área aproximada de 803 km<sup>2</sup> e uma população de 74.966 habitantes (IBGE, 2011). É cercado por montes e picos, e dita 320 km da capital Teresina, pela BR-316. O município por apresentar prosperidade em diversos setores da economia, é conhecido no estado como "município modelo" (BARBOSA et al., 2007).

O clima da região é semi-árido, a partir da observação de parâmetros climáticos associados à observação da vegetação, relevo, solo e hidrografia. São características desse domínio climático: uma precipitação média anual inferior à 900 mm e dois a três meses favoráveis à ocorrência de chuvas (FILHO e GOMES, 2004). A temperatura média anual da região é da ordem de 27,3 °C, observando-se as médias elevadas na primavera (setembro/outubro) e as mais baixas, no outono (março/maio). A umidade relativa média anual é de 59,4%. Os maiores índices ocorrem entre março e abril, e os

menores entre setembro e outubro. A insolação total média anual é de 2.406,4 horas (FREITAS, 2002).

### 1.2.2 Importância do rio Guaribas e caracterização dos problemas antropogênicos

Os corpos d'água diluem e carregam facilmente os mais diversos poluentes, que podem ser provenientes do ar e dos solos lavados pelas chuvas, ou que neles são lançados diretamente pela ação antrópica (CUKROV et al., 2012).

A contaminação da água tem diferentes fontes, como resíduos da vida rural e urbana ou da indústria. Diariamente, grandes volumes de esgoto não tratados são lançados diretamente nos corpos de água. A indústria utiliza em seus processos uma enorme quantidade de água, que muitas vezes são devolvidas ao ambiente com sua qualidade comprometida. Outra importante fonte de contaminação da água é gerada pela liberação de pesticidas (OHE et al., 2004; MAGDEBURG et al., 2014; BARSIENTE et al., 2015).

A contaminação, como em outros rios, também ocorre no rio Guaribas, que segundo Filho e Gomes (2004) é o importante rio da Mesorregião Sudeste do Piauí, onde sua bacia hidrográfica corresponde aproximadamente a 3, 35% da área do estado. O rio em questão tem grande importância na economia da macrorregião, pois por meio de suas águas se desenvolveram e ainda se desenvolvem diversas atividades econômicas, como, por exemplo, o cultivo de alho, que no passado, fez da região uma das maiores produtoras deste vegetal. Hoje em dia o que mais se destaca de atividades econômicas utilizando o rio Guaribas ou as suas águas são a criação de peixes e o cultivo de alimentos, onde este último pode acarretar na eliminação de pesticidas nas águas do rio (VELOSO et al., 2014).

Outras ações antropogênicas de fator importante na contaminação do rio são os despejos dos resíduos da vida urbana e da indústria nas suas águas, pois nestas são lançadas todos os esgotos e dejetos produzidos na cidade, como por exemplo, esgoto de hospitais e clínicas, esgotos de residências e indústrias, podendo haver assim descargas tóxicas nessas águas.

O impacto sofrido por rios que recebem descargas tóxicas é determinado pelo tipo e concentração dos agentes introduzidos, a duração do lançamento, o tipo de exposição, a capacidade do ecossistema para resistir a essas mudanças, o tempo necessário para o retorno ao estado de equilíbrio, após remoção do composto, e a

localização do ecossistema em relação ao local de deposição da substância (LEMOS e TERRA, 2003; AKINBORO et al. 2011). A presença de poluentes na água, além de afetar os organismos que habitam nela, pode também repercutir em organismos não aquáticos via cadeia alimentar ou simplesmente como resultado da ingestão de água contaminada (GAUTHIER et al., 2004; KERN et al. 2015).

## **Análises físicas, químicas e genotóxicas em um rio tropical (Brasil) sob a influência da ação antropogênica**

**Autores e filiação:** João M. de C e Sousa<sup>1</sup>; Ana P. Peron<sup>1</sup>; Felipe C. C. da Silva<sup>1</sup>; Ana Cleide Ramos<sup>1</sup>; Ellifran B. de S. Dantas<sup>1</sup>; Ataíde de Macedo Vieira Lima<sup>1</sup>; Vitor A. de Oliveira<sup>1</sup>; Leomá A. Matos<sup>2</sup>; Marcus Vinícius O. B. de Alencar<sup>3</sup>; Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante<sup>3</sup>; Cláudia Costa Bonecker<sup>4</sup>; Horácio F. J. Junior<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros. Av. Cícero Duarte, Picos, Piauí. CEP – 64.600-000, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela. Bairro Ininga. Teresina, Piauí. CEP - 64049-550, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela. Bairro Ininga. Teresina, Piauí. CEP - 64049-550, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Maringá, Paraná. CEP - 87020-900, Brasil.

\*Email: [j.marcelo@ufpi.edu.br](mailto:j.marcelo@ufpi.edu.br). Fone: 8681006336

### **Resumo**

Rios tropicais, em geral, estão sobre intenso impacto de ações antrópicas e são utilizados, principalmente, para abastecimento, irrigação e piscicultura. Esse estudo objetivou avaliar as condições físicas, químicas e genotóxicas das águas do rio Guaribas, localizado no nordeste brasileiro, que percorre uma região de 20 pequenos municípios inseridos no semiárido (Estado do Piauí, Brasil), nos períodos de seca e chuva. Foram analisadas algumas variáveis físicas e químicas da água e sua genotoxicidade em nível celular por meio do bioensaio cometa, como sistema teste, utilizando o sangue branquial de *Oreochromis niloticus*. Os resultados da qualidade de água mostraram que os locais dentro e depois da cidade de Picos, principal cidade a sua margem, independente do período analisado, possuem variáveis acima dos valores aceitáveis para legislação vigente do país, sendo significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os locais antes da cidade. Apresentam-se como hipereutróficos, característicos de locais poluídos, com processo de eutrofização artificial. Para os resultados genotóxicos, os locais dentro e depois da mesma cidade também foram significativos ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle negativo, confirmando, assim, a relação direta entre a poluição e o dano genético. A ação antrópica da cidade libera nesses locais metais pesados, como Fe, Zn, Cr, Cu e Al, que foram genotóxicos para o material genético das células sanguíneas estudadas. Portanto, o rio Guaribas, durante todo o ano, apresenta-se como um ambiente aquático poluído nos trechos dentro e depois da cidade de Picos-PI, com liberação de produtos químicos causadores de danos genéticos nos organismos que vivem nesse ambiente. É necessário adotar medidas para o permanente biomonitoramento ambiental de importância para a saúde do ecossistema, incluindo a qualidade de vida humana.

**Palavras-chave:** Poluição aquática; Ecotoxicologia, Metais, Genotoxicidade em ecossistemas.



## Abstract

Tropical rivers, in general, are under strong impact of human activities and are mainly used for supply, irrigation and fish farming. This study aimed to evaluate the physical, chemical and genotoxic conditions of water of the Guaribas river, located in northeastern Brazil, which crosses a region with 30 small municipalities in the semi-arid (State of Piauí, Brazil), in the dry and rainy periods. Physical and chemical variables of water were analyzed as well as its genotoxicity at the cellular level through the comet assay, as a test system, using the blood of the gills of *Oreochromis niloticus*. In sites within and downstream of the city of Picos, the largest city on its banks, regardless of the period analyzed, values of variables were above acceptable limits set by the current laws of the country, being significantly higher ( $p < 0.05$ ) when compared with sites upstream of the city. Sites were characterized as hypereutrophic, typical of polluted sites, under artificial eutrophication process. For genotoxic results, sites within and downstream of the same city were also significant ( $p < 0.001$ ) when compared to the negative control, thus confirming the direct relationship between pollution and genetic damage. Anthropogenic activities of the city release heavy metals into these sites, such as Fe, Zn, Cr, Cu and Al, which were genotoxic to the genetic material of the studied blood cells. Therefore, the Guaribas River is an aquatic environment with polluted stretches within and downstream of the city of Picos, state of Piauí, receiving discharges of chemicals that cause genetic damage to organisms living therein. It is necessary to adopt measures for the permanent biomonitoring, important for ecosystem health, including quality of human life.

Key words: Aquatic pollution; Ecotoxicology; Metals; Genotoxicity in ecosystems

## 2.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional sem melhorias de infraestrutura tem acarretado alterações ambientais não muito favoráveis e condizentes com a manutenção dos recursos naturais, pois propicia a liberação indiscriminada de agentes poluidores no ambiente, como agrotóxicos, efluentes industriais e domésticos, com alta carga de matéria orgânica. A contaminação dos vários ambientes por meio dessa atividade pode resultar em consequências irreversíveis para o ambiente e para os organismos que habitam estes locais (Manzano et al., 2015).

Os rios, por exemplo, são coletores naturais dos resíduos produzidos em áreas rurais, urbanas e polos industriais, podendo causar diminuição de habitats, microhabitats, diversidade de espécies, qualidade dos recursos e provocar eutrofização artificial (enriquecimento do ambiente aquático por aumento nas concentrações de fósforo e nitrogênio) (Goulart e Callisto, 2003). Tradicionalmente, a avaliação de impactos nos ambientes aquáticos tem sido realizada através da medição de alterações nas concentrações de algumas variáveis físicas e químicas, como a temperatura,

concentração de oxigênio dissolvido, nutrientes e pH. Este sistema de monitoramento constitui-se como ferramenta fundamental na classificação e enquadramento de rios e córregos em classes de qualidade de água e padrões de potabilidade e balneabilidade humanas (Kazi et al., 2009).

O monitoramento de variáveis físicas e químicas traz algumas vantagens na avaliação de impactos nesses ambientes, tais como: identificação imediata de modificações nas propriedades físicas e químicas da água, detecção precisa da variável modificada e determinação destas concentrações alteradas. No entanto, este monitoramento não determina os efeitos toxicológicos de xenobióticos nos organismos aquáticos, o que torna os estudos toxicológicos, adicionalmente, importantes para a avaliação do impacto ambiental, principalmente em nível celular (Whitfield, 2001; Muangthong e Shrestha, 2015).

Todos os seres vivos estão em interação com o meio ambiente e os mesmos sofrem influência deste, o que pode ocasionar modificações em seu material genético (Farmer e Sing, 2008). As modificações no índice de divisão celular e/ou na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Estas modificações também podem causar mutações gênicas e aberrações cromossômicas, eventos estes que podem levar ao desenvolvimento de processos cancerosos ou morte celular (Ossana et al., 2013). A detecção destes produtos poluentes e seus prováveis efeitos nos organismos são importantes no estudo do impacto, visto que é possível avaliar o que eles podem causar às populações animal, vegetal e humana (Leme e Marin-Morales, 2009).

Os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e na saúde humana devem ser analisados por meio de metodologias de detecção eficientes. A utilização de bioensaios e de bioindicadores para a verificação de danos no material genético tem permitido a quantificação e reconhecimento de uma ampla gama de substâncias genotóxicas em estudos de mutagênese ambiental (Mazzeo et al., 2013). No presente estudo, o bioensaio utilizado para a avaliação genotóxica do ambiente aquático foi o Ensaio Cometa (SCGE), que é um método de detecção rápida para contaminantes químicos perigosos e presença de poluentes, com potencial mutagênico em ambientes aquáticos. O SCGE é atualmente o ensaio mais empregado para detectar lesões em estudos de ecotoxicologia aquática (Frenzilli et al., 2009).

Algumas espécies de peixes são organismos bioindicadores adequados porque eles acumulam e respondem a baixas concentrações de poluentes ambientais e agentes

mutagênicos. A espécie de peixe *Oreochromis niloticus* é considerada como bioindicador animal extensamente utilizado no biomonitoramento de ambientes aquáticos, e na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos dos variados xenobióticos liberados ao meio ambiente (Rocha et al., 2009; Barbosa et al., 2010; Osman, 2010).

O município de Picos localiza-se na região Centro/Sul do Estado do Piauí (7°04'37" S; 41°28'01"O), com uma área aproximada de 803 km<sup>2</sup> e uma população de 76.309 habitantes (IBGE, 2014). O principal rio dessa região é o Guaribas, que juntamente com alguns riachos formam a bacia hidrográfica que recebe o mesmo nome. Esta bacia hidrográfica é de grande importância com relação à captação de água para o abastecimento, desenvolvimento de atividades agropecuárias e turismo ecológico da grande maioria das cidades do estado do Piauí, abrangendo, atualmente, mais de 30 municípios do Estado. Entretanto, nesse ambiente, devido ao desmatamento desenfreado, consequência da rápida colonização e do contínuo crescimento urbano, tem-se registrado gradativas alterações ambientais, as quais causam prejuízos sobre no ciclo hidrológico local (Andrade-Junior et al., 2006; Veloso et al., 2014).

Além das vulnerabilidades climáticas do semiárido, típico da região onde se encontra a bacia do rio Guaribas, grande parte dos solos encontra-se degradada. Dados do Instituto Brasileiro Geografia e Estatística (IBGE), de 1994 já afirmavam que 54% do bioma caatinga, com vegetação característica do semi-árido, encontrava-se em elevado estágio de antropização. Como consequência, os recursos hídricos apresentam elevados índices de poluição, devido à liberação de lixo doméstico, hospitalar e industrial, como verificado no rio Guaribas, o que torna a situação ainda mais séria, em virtude da falta de água ser fator crítico do semiárido: primeiro, porque é o limitador da ocupação humana; e, segundo, porque é inibidor das atividades produtivas (PLANAP, 2014).

O rio Guaribas é mais um exemplo de muitos outros rios da região Nordeste do país que passam por um processo de degradação intensa e desenfreada, causado pela ação antropogênica e potencializado pelas condições climáticas desfavoráveis, com baixos índices pluviométricos o ano todo. Nesse caso, estudos de biomonitoramento tornam-se cada vez mais necessários para esse tipo de ambiente aquático, a fim de se conhecer a qualidade de água que a população atualmente utiliza, bem como contaminantes químicos com potencial genotóxico.

Assim, o presente estudo propôs o primeiro biomonitoramento físico-químico e genético do rio Guaribas, utilizando bioindicador e bioensaio adequados para estudo de ecotoxicologia, podendo, desta forma, avaliar a influência de uma cidade, representada pela sua atividade antropogênica, sobre um ambiente aquático e os organismos que vivem nele, além de avaliar diferenças ambientais e toxicogenéticas entre os períodos de chuva e seca em ambientes aquáticos no semiárido.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Área de estudo e pontos de coleta**

Para avaliar a influência da ação antrópica, representada pela cidade de Picos, sobre a qualidade de água e a genotoxicidade no rio Guaribas, foram definidos pontos antes, dentro e depois da cidade: CN (controle), açude de Bocaina, localizado 32 km antes da cidade de Picos (06° 56' 33" S e 41° 19' 21" W); P1, antes da cidade de Picos (município de Sussuapara) (07° 03' 864" S e 41° 25' 788" W); P2, 1° ponto dentro da cidade (07° 04' 964" S e 41° 27' 879" W); P3, 2° ponto dentro da cidade (07° 05' 3135" S e 41° 28' 007" W); P4, 3° ponto dentro da cidade (07° 05' 487" S e 41° 28' 678" W) e P5, depois da cidade de Picos (município de Aroeira) (07° 06' 047" S e 41° 29' 145"). Os pontos dentro da cidade foram definidos de forma que ficassem igualmente distantes e próximos a locais onde há entrada de água proveniente de pequenos córregos, que, por sua vez, recebessem efluentes de esgotos domésticos, dejetos hospitalares, postos de gasolina e locais onde há a presença constante de populações ribeirinhas. Já os pontos antes e depois da cidade foram igualmente distantes da entrada e saída da cidade, respectivamente (Figura 1).

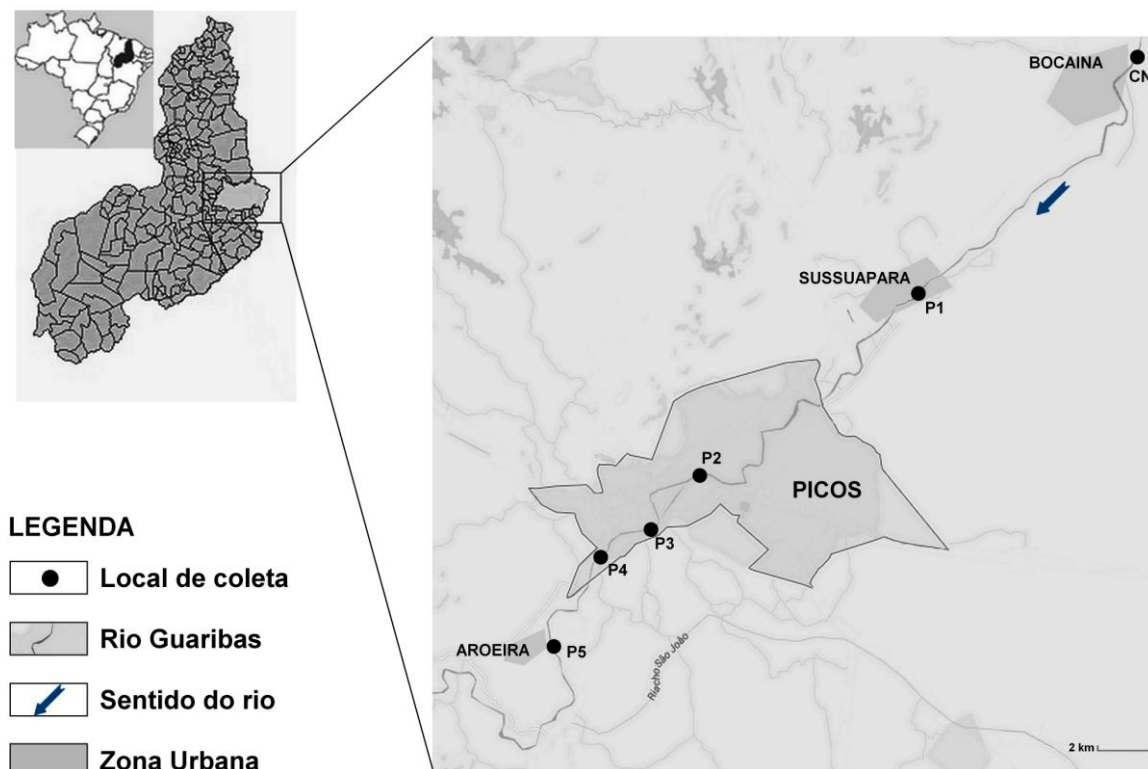


Figura 1: Localização geográfica da região de estudo e dos pontos amostrais (Ponto 1 – antes da cidade; Ponto 2 a Ponto 4 – dentro da cidade; Ponto 5 – depois da cidade) do rio Guaribas, Picos-PI/Brasil. CN: Controle negativo.

Para melhor caracterizar as condições climáticas da região de estudo, dados como temperatura, umidade e precipitação dos meses de coletas para aos períodos de seca e chuva nessa região semiárida do país foram obtidas através do INMET – Instituto Nacional de Meteorologia – Brasil (2015).

As coletas foram realizadas em quatro meses, considerando os períodos de seca (setembro/2013; setembro/2014) e chuva (fevereiro/2014; fevereiro/2015) na região. Assim, as escalas utilizadas para o estudo foram: espacial (pontos de coleta ao longo do rio) e temporal (períodos de seca e chuva).

As amostras de águas, na sub-superfície, foram coletadas com garrafas plásticas de polietileno de 1.5L e galões de 150L, previamente descontaminados com várias lavagens com água destilada e assepsia com ácido a 10%. Todas as amostras de 1.5L foram estocadas em isopor com gelo e levadas imediatamente para o laboratório para serem estocadas a 4°C e posteriormente utilizadas para análises físicas e químicas da água. Já as amostras de água (galões de 150L) para o Ensaio cometa em peixes foram colocadas imediatamente nos aquários previamente identificados para os diferentes

locais de coleta. As amostras de água para os controles (controles negativo e positivo) foram obtidas no açude de Bocaina, local onde também foram adquiridos (ou comprados) os peixes para os experimentos. As amostras foram coletadas em triplicata para análises físicas e químicas; metais e avaliação genotóxica por local de coleta.

### 2.2.2 Análises físicas e químicas da água

No momento da coleta das amostras de água, algumas variáveis físicas e químicas foram estimados, em tréplica, em cada ponto, com o auxílio de aparelhos portáteis, (HANNA), sendo estes condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), sólidos dissolvidos totais (ppm), pH; oxigênio dissolvido (ppm), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). Outras variáveis foram determinadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública "Dr Costa Alvarenga" – LACEN, do Estado do Piauí, sendo estes turbidez (NTU), cor (UHz), nitrato (mg/L), nitrito (mg/L), sulfato (mg/L), e cloro (mg/L), com auxílio de espectrofotômetro (modelo DR 2500, ODYSSEY – HACH), além da medição de fósforo total (mg/L), pelo método de digestão com persulfato (MACKERETH et al., 1978). Os valores dessas variáveis também foram estimados em tréplica no laboratório.

Os níveis de ferro, níquel, cádmio, zinco, cobre e cromo foram determinados por espectrofotometria em chama de absorção atômica (APHA, 2005). Para estas análises, imediatamente depois da coleta, as amostras de água foram acidificadas e posteriormente foram submetidas à digestão ácida e subsequente concentração para leitura em espectrofotômetro de absorção atômica (modelo Varian-AA50B). Já o alumínio foi quantificado pelo Standard methods for the examination of water and wastewater (Rice et al., 2012). Cada amostra foi quantificada em triplicata.

### 2.2.3 Bioensaios com *Oreochromis niloticus*

A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) foi o sistema-teste animal utilizado para os ensaios *in vivo* em condições de laboratório. Os animais foram aclimatados ( $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pH  $7,8 \pm 0,3$ ) e posteriormente transferidos para aquários nas mesmas condições anteriores. Cada aquário recebeu um exemplar, que permaneceu exposto à água do rio Guaribas durante 72 horas de tratamento, sendo utilizados 03 organismos por ponto e controles, totalizando 21 exemplares.

Após o período de exposição, foram retirados de cada animal 0,5 ml de sangue, por meio de punção branquial, com auxílio de seringas heparinizadas, para a realização do ensaio cometa. Logo após a punção, os exemplares foram colocados em outro recipiente com uma solução anestésica profunda, para sedação e morte dos mesmos de acordo com a CEUA, 2008 (Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação / Brasil). O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Piauí / Brasil com o número: 108/14.

#### 2.2.4 Ensaio Cometa

A versão alcalina do Ensaio Cometa foi realizada de acordo com o protocolo de Singh et al. (1988), com modificações. O procedimento consistiu em misturar em um microtubo, cuidadosamente, 5  $\mu$ L de sangue branquial de peixes com 100  $\mu$ L de agarose, de baixo ponto de fusão (0,5%), à 37°C. Em seguida, a mistura foi espalhada sobre uma lâmina, previamente coberta com agarose de normal ponto de fusão (1.5%), e coberta com lamínula. As lâminas preparadas foram para geladeira por 10min, para solidificar a agarose e posterior remoção da lamínula. Logo depois, as lâminas foram mergulhadas na posição vertical em recipientes, protegidos da luz, com solução de lise gelada (89% de sol. lise estoque, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH=10; solução de lise estoque 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, pH=10), e a fresco, por no mínimo 12h. Passado o tempo de lise, as lâminas foram submetidas à eletroforese em solução alcalina de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH>13), nas seguintes condições: 20 V (0.74 V/cm), 300 mA, 20 min em ambiente de baixa luminosidade. Após a eletroforese, as mesmas foram neutralizadas em tris-HCl (0,4 M, pH=7.5) gelado por 15min, mergulhadas em água destilada gelada, e secas ao ar livre. Finalmente, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto gelado por 3min, secas ao ar livre e o DNA foi corado com nitrato de prata, baseado no protocolo de Cerda et al. (1997). Os padrões de migração do DNA foram visualmente determinados pelo tamanho da cauda do cometa em cinco classes, de 0 (ausência de dano) a 4 (dano máximo), segundo Collins (2004), amplamente reproduzido na literatura (Hartmann et al., 2003; Burlinson et al., 2007).

Para cada lâmina, foram examinadas 100 células, 200 por animal e 600 para cada local de coleta e controle. Foram considerados dois parâmetros: o índice de danos – ID (0-400) e frequência de danos – FD (0-100%). Para o cálculo ID, as células foram, visualmente, classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda dos

cometas (0 = sem cauda; 4 = máximo comprimento da cauda), o que resultou em um escore único de danos ao DNA de cada repetição (peixe) e, conseqüentemente, para cada grupo estudado.

A FD em % foi calculada para cada repetição (peixe) com base no número de células com cauda em relação às células com dano 0:  $FD = 100 - N0$ . Todas as lâminas foram codificadas para análise cega. O agente citotóxico e mutagênico utilizado como controle positivo para o teste genotóxico, de acordo com Bolognesi e Hayashi (2011), foi a ciclofosfamida na concentração de 4 mg/L, injetado intraperitonealmente, abaixo da nadadeira peitoral.

### 2.2.5 Análise Estatística

Para iniciar as análises estatísticas, foram realizados testes de normalidade (Teste de Kolmogorov – Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Levene) para saber se seriam usados testes paramétricos ou não paramétricos para resolução dos mesmos. Os dados se apresentaram com distribuição normal e homogêneos. Assim, para detectar diferenças estatísticas entre os períodos e entre os locais de coleta analisados foi utilizado ANOVA, com pós teste de Tukey para as análises físicas, químicas e toxicogénica. Correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre danos genotóxicos e metais acumulados. Todos os dados foram analisados com o software STATISTIC 6.0, e os resultados das análises foram considerados significativos quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização Físico-química e a Qualidade da água

Os dados meteorológicos coletados durante o período de estudo confirmaram a escassez de chuva nos meses de coleta dos períodos de seca (2013 e 2014), bem como o baixo índice pluviométrico nos meses considerados chuvosos (2014 e 2015) (tabela 01).



Tabela 01: Dados meteorológicos dos meses de coletas para os períodos de seca e chuva na região Nordeste do Brasil.

Estação/Ano	Mês de coleta	Temperatura máxima Mensal (°C)*	Temperatura mínima mensal (°C)*	Umidade relativa mensal*	Precipitação total mensal (mm <sup>3</sup> )*	Dias com chuva*
Seca/2013	Setembro	37.4	23.6	37.3	0	0
Chuvoso/2014	Fevereiro	33.2	23.4	61.1	109.6	08
Seca/2014	Setembro	38.3	23.8	42.6	0	0
Chuvoso/2015	Fevereiro	34.3	23.6	66.1	64	12

\*Dados referentes ao mês de coleta. Fonte: INMET – Instituto Nacional de Meteorologia – Brasil (2015).

A ação antropogênica desenfreada no ambiente aquático se intensifica pelas condições climáticas que se apresentam em alguns locais do mundo, como por exemplo, a região Nordeste do Brasil (Marcon et al., 2010). O estado do Piauí, um dos estados formadores da região Nordeste do País, possui a bacia hidrográfica do rio Guaribas que vem sofrendo nos últimos anos com esse tipo de problema. Nessa região os períodos considerados secos se prolongam por meses durante o ano.

As regiões semiáridas do Nordeste brasileiro são caracterizadas pela escassez de recursos hídricos, precipitações pluviométricas baixas e irregulares que é agravada pela precária distribuição de água e saneamento básico, aumentando assim os efeitos tóxicos de poluentes químicos liberados pela ação antrópica (Amr e Yassin, 2008). Este fato é particularmente agravado já que o rio em questão é lântico na maior parte do ano, principalmente em períodos de seca, sendo lótico em poucos meses, quando o índice pluviométrico é elevado.

Os resultados para qualidade de água nos pontos de coleta foram comparados com os índices propostos pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA- 357/2005) e mostraram que as variáveis sólidos dissolvidos totais (SDT), oxigênio dissolvido (OD), turbidez, cor, cloro, fósforo total apresentaram valores acima do aceitável (VMP) nos dois períodos de estudo. Comparando os resultados por localização dos pontos (antes, dentro e depois da cidade) observou-se também que as variáveis: turbidez, cor, nitrato, sulfato, cloro e PT em pontos dentro (P2, P3 e P4) e depois da cidade (P5) possuem valores significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o ponto controle (CN) e antes da cidade (P1) (Tabela 02).

Tabela 02: Resultados das variáveis físicas e-químicas e indicadores da qualidade da água no rio Guaribas, Piauí, nos períodos de seca e chuva.

Variáveis	VMP	Seca / 2013						Seca / 2014					
		CN	P1	P2	P3	P4	P5	CN	P1	P2	P3	P4	P5
Cond. µS/cm	-	75	98	321	384	413	400	89	127	990	960	970	980
SDT	<500(ppm)	139	126	149	193	193	510*	186	193	508*	485	493	490
pH	6 a 9	7.3	6.8	6.7	6.5	6.4	7.1	7.4	6.5	7.8	7.5	8.1	7.2
OD	> 5(ppm)	6.4	6.1	2.1*	0.8*	2.6*	1.3*	6.1	3.7	4.2*	0.8*	2.0*	1.5*
Turbidez	< 5 (NTU)	3.9	4.7	25.9*a	38.1*a	10.7*	52.3*a	3.9	4.4	47.6*a	51.4*a	27.4*	50.7*a
Cor	< 75(UHz)	58	65	419*a	448*a	442*a	496*a	67	72	476*a	392*a	472*a	486*a
Nitrato	<10(mg/L)	1.1	1.2	4.0	7.7 <sup>a</sup>	2.5	5.6 <sup>a</sup>	1.3	1.5	4.3a	8.0a	2.5	6.0a
Nitrito	<1 (mg/L)	0.01	0.04	0.02	0.1 <sup>a</sup>	0.06	0.04	0.01	0.01	0.02	0.1	0.05	0.1
Sulfato	<250(mg/L)	13.6	6.3	14	27 <sup>a</sup>	19.7	55.3 <sup>a</sup>	13.6	3.9	27	43.6a	39.3a	43a
Cloro	<0,01(mg/L)	0.11*	0.09*	0.5*a	0.7*a	0.2*	0.5*a	0.1*	0.1*	0.6*a	0.7*a	0.3*	0.6*a
PT	<0,05(mg/L)	0.03	0.04	2.2*a	1.5*a	1.4*a	2.8*a	0.03	0.07*	2.4*a	1.6*a	1.4*a	2.9*a
Variáveis	VMP	Chuvoso / 2014						Chuvoso / 2015					
Cond. µS/cm	-	85	82	337	374	472	405	90	96	996	721	822	809
SDT	<500(ppm)	143	126	174	185	236	229	163	138	496	360	411	405
pH	6 a 9	7.3	7.5	7.2	7.4	7.4	7.6	7.1	8.8	7.9	7.7	7.6	8.0
OD	> 5(ppm)	6.9	5.1	2.2*	2.1*	2.5*	2.8*	5.2	5.0	1.9*	1.5*	1.4*	2.0*
Turbidez	< 5(NTU)	3.7	4.5	4.8	4.7	30.7*a	3.9	3.9	2.1	4.9a	5.9*a	5.9*a	28.7*a
Cor	< 75(UHz)	48	27.3	156*a	86.6*a	100*a	378.3*a	73*	31.3	88*	103*a	102.6*a	367.8*a
Nitrato	<10(mg/L)	0.9	0.03	0.4	0.2	0.4	6.5 <sup>a</sup>	1.4	0.03	0.5	0.3	0.3	5.5a
Nitrito	<1(mg/L)	0.01	ND	ND	0.01	0.01	0.04	0.01	ND	0.01	0.02	0.04	0.04
Sulfato	<250(mg/L)	15.67	ND	0.01b	1.8b	1.1b	2.1b	2.1	0.01	0.01	2.1	1.2	2.1
Cloro	<0,01(mg/L)	0.19*	0.05*	0.17*	0.09*	0.06*	0.5*a	0.19*	0.06*	0.2*	0.1*	0.1*	0.5*a
PT	<0,05(mg/L)	0.02	0.09*	2.6*a	1.6*a	1.4*a	2.9*a	0.03	0.04	2.2*a	1.5*a	1.3*a	2.6*a

VMP: Valor máximo permitido pela Legislação Brasileira. ND: Valor não detectado. (\*) Valores acima dos padrões de qualidade de água das leis brasileiras - CONAMA 357/05. <sup>a</sup>: valores superiores quando comparados com o CN (controle) e P1 referente ao mesmo parâmetro e período (p < 0,05). <sup>b</sup>: valores menores quando comparado com CN e P1, referente ao mesmo parâmetro e período (p < 0,05).

As variáveis físicas e químicas com valores fora dos aceitáveis pela legislação e superiores quando comparados ao ponto controle (CN) e antes da cidade (P1) são medidas diretas ou indiretas da concentração de poluentes no ambiente aquático, sendo, nesse caso, fundamentais para estudos de caracterização e qualidade de água. A variável condutividade elétrica, por exemplo, apresentou os maiores valores para os pontos dentro (P2, P3 e P4) e depois da cidade (P5), sendo a mesma uma medida indireta da concentração de poluentes, podendo ajudar a detectar fontes poluidoras dos ecossistemas aquáticos e fornecer dados sobre o metabolismo do ambiente (Esteves, 2011). Verificou-se, ainda, um aumento progressivo da condutividade elétrica ao longo do curso do rio, desde o açude de Bocaina (CN) até os pontos dentro da cidade (P2 a P4), e mantendo-se elevado após a cidade (P5). Esse gradiente mostra, de acordo com Marinelli et al. (2000), a presença de materiais dissolvidos e sua contribuição para a diminuição da qualidade da água do rio. Segundo a Companhia de Tecnologia em Saneamento Ambiental-CETESB (2005), os níveis de condutividade elétrica superiores a 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  são característicos de ambientes impactados; assim, utilizando essa variável como parâmetro, pode se considerar que o trecho dentro e após a cidade, independente do período analisado, encontra-se impactado.

De acordo com as leis brasileiras (CONAMA-357/2005) o valor de OD na água deve ser superior a 5 ppm. Ao longo do curso do rio, observou-se uma diminuição dos valores desse parâmetro em pontos dentro (P2 a P4) e depois da cidade (P5), valores estes considerados abaixo do permitido. O baixo índice de OD encontrado em pontos com ação antrópica é reflexo da maior atividade biológica no ambiente por conta do seu estado trófico e decorre do aporte de grandes cargas de matéria orgânica e resíduo industrial; indicando, assim, um processo de eutrofização nesses pontos (Birungi et al., 2007; Dusmann et al., 2014). Bianchi et al. (2011) afirmam que quando os níveis de OD na água são inferiores aos níveis necessários para as ações de biodegradação de uma matéria orgânica, a qualidade desta água é prejudicada.

Os valores encontrados para fósforo total (PT) em pontos do rio a partir da cidade (P2 a P5) foram significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores aos pontos analisados antes da cidade (CN e P1). Esses elevados valores de PT estão associados com a eutrofização artificial nesse trecho do rio. Utilizando a classificação de Wetzel (2001) sobre o estado trófico dos corpos d'água em relação às concentrações de PT, os pontos de dentro e após a cidade (P2 a P5), nos quatro meses analisados, foram classificados como hipereutróficos, pois os valores foram superiores a 1,2 ml/L. O fósforo nesses

locais amostrados é oriundo, principalmente, de descargas de esgotos da população ribeirinha local e drenagem agrícola presente as margens do rio estudado.

Os esgotos sanitários e diversos efluentes industriais também provocam elevações dos sólidos dissolvidos totais (SDT) no ambiente aquático. SDT são componentes comuns de muitos efluentes, mas ainda não são tipicamente bem caracterizados em termos de constituintes químicos ou toxicidade. Representam uma medida integrativa das concentrações de íons comuns (cloretos, sulfatos, bicarbonatos e outros) em águas doces (Barbosa et al., 2010).

A toxicidade relacionada com estes íons é devido à combinação e concentração elevada de íons específicos. Devido essa provável toxicidade, algumas autoridades reguladoras estabeleceram limites de SDT para organismos de água doce, geralmente relacionadas com cloro e outras concentrações de sal como sulfatos (Mihaljevic et al., 2011). Por exemplo, no estado do Alaska (EUA) o máximo permitido é 1.500 mg/L (Mihara et al., 2008), já no Brasil, o CONAMA (2005) estabelece valores abaixo de 500 ppm para SDT, abaixo de 250 mg/L para sulfatos e 0,01 mg/L para íons cloro. Para o presente estudo, apenas os pontos P5 e P2 ficaram com valores acima do permitido para SDT nos períodos de seca de 2013 e 2014, respectivamente. Já para medidas de sulfato, os pontos P2 a P5 ficaram com valores estatisticamente acima ( $p < 0,05$ ) do CN (açude de Bocaina) para os dois períodos de seca, porém com valores abaixo ( $p < 0,05$ ) do CN no período chuvoso/2014. Para o íon cloro, todos os pontos, independente do período analisado, apresentaram valores acima do permitido pela legislação do país.

Em adição aos parâmetros anteriormente avaliados, analisou-se também a presença de metais pesados ao longo do rio Guaribas. O aumento dos níveis de metais em ambientes aquáticos causados por efluentes industriais e domésticos é um dos principais indicadores de contaminação química (Manzano et al., 2015) como também responsáveis por efeitos genotóxicos nos organismos que entram em contato com esse tipo de contaminação (Bianchi et al., 2011; Klobucar et al., 2012). A análise das águas nos períodos estudados mostrou valores de Fe, Zn, Cu, Cr e Al acima dos valores permitidos pela Legislação Ambiental Brasileira em pontos onde a cidade de Picos está a margem do rio continuando para o P5, depois da cidade (Tabela 03).

Portanto, os resultados dos parâmetros físico-químicos mostram a presença da ação antropogênica e consequente poluição no ambiente aquático analisado (rio Guaribas) dentro e depois da cidade em estudo (Picos-PI) apresentando uma elevada eutroficação artificial nesses pontos. O rio em questão não apresenta contaminação

ambiental antes da cidade já que tanto o controle (açude de Bocaina) como o ponto P1, localizado no município de Sussuapara-PI apresentaram parâmetros aceitáveis pela legislação vigente do País.

Tabela 03: Níveis de metais presentes nos pontos coletados do rio Guaribas-PI/Brasil analisados por espectrofotometria em chama de absorção atômica.

		Metais (mg/L)						
		Fe	Ni	Cd	Zn	Al	Cu	Cr
VMP		0.3	0.025	0.001	0.18	0.1	0.009	0.05
Período	Pontos							
Seca/2013	CN	0.01 ± 0	Nd	nd	0.04 ± 0.02	0 ± 0	0 ± 0	0.005 ± 0.003
	P1	0.19 ± 0.1	Nd	nd	0.025 ± 0.01	0.003 ± 0.004	0.009 ± 0.003	0.002 ± 0
	P2	0.33 ± 0.06*	Nd	nd	0.03 ± 0.006	0.07 ± 0.04	0.02 ± 0.001	0.017 ± 0.008*
	P3	0.48 ± 0.18*	Nd	nd	0.04 ± 0.006	0.083 ± 0.07	0.015 ± 0.002	0.06 ± 0.02*
	P4	0.15 ± 0.03	Nd	nd	0.23 ± 0.03*	0.2 ± 0.06*	0.055 ± 0.003*	0.015 ± 0.003*
	P5	0.09 ± 0.004	Nd	nd	0.19 ± 0.02*	0.126 ± 0.04*	0.013 ± 0	0.02 ± 0*
Chuvoso/2014	CN	0.01 ± 0.004	Nd	nd	0.02 ± 0	0 ± 0.003	0.001 ± 0	0.006 ± 0.004
	P1	0.07 ± 0.02	Nd	nd	0.035 ± 0.003	0 ± 0.004	0.016 ± 0.009*	0.012 ± 0.005
	P2	0.15 ± 0	Nd	nd	0.08 ± 0.007	0.07 ± 0.02	0.005 ± 0.003	0.055 ± 0.01*
	P3	0.13 ± 0.006	Nd	nd	0.075 ± 0.02	0.24 ± 0.03*	0.08 ± 0*	0.052 ± 0.03*
	P4	0.15 ± 0.02	Nd	nd	0.195 ± 0.01	0.16 ± 0.04*	0.01 ± 0*	0.042 ± 0.02
	P5	0.6 ± 0.05*	Nd	nd	0.21 ± 0.07	0.13 ± 0.05*	0.02 ± 0.006*	0.055 ± 0.01*
Seco/2014	CN	0.01 ± 0.004	Nd	nd	0.049 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0
	P1	0.01 ± 0.004	Nd	nd	0.055 ± 0.03	0.03 ± 0.04	0.001 ± 0	0.004 ± 0.001
	P2	0.04 ± 0	Nd	nd	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0	0.02 ± 0.006*	0.004 ± 0.002
	P3	0.01 ± 0.007	Nd	nd	0.10 ± 0	0.22 ± 0.07*	0.035 ± 0*	0.077 ± 0.002*
	P4	0.05 ± 0.003	Nd	nd	0.35 ± 0.01*	0.156 ± 0.02*	0.49 ± 0.21*	0.055 ± 0.001*
	P5	0.08 ± 0.008	Nd	nd	0.215 ± 0.01*	0.16 ± 0*	0.1 ± 0.02*	0.03 ± 0.006
Chuvoso/2015	CN	0.01 ± 0.004	Nd	nd	0.007 ± 0.003	0.002 ± 0.001	0 ± 0	0.002 ± 0.001
	P1	0.08 ± 0.01	Nd	nd	0.02 ± 0.01	0.003 ± 0.003	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.004
	P2	0.33 ± 0.07*	Nd	nd	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.002 ± 0.001	0.031 ± 0.005
	P3	0.13 ± 0.006	Nd	nd	0.10 ± 0.06	0.13 ± 0.05*	0.066 ± 0.01*	0.041 ± 0.038
	P4	0.17 ± 0.005	Nd	nd	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.004	0.019 ± 0.01*	0.06 ± 0.01*
	P5	0.71 ± 0.03*	Nd	nd	0.20 ± 0.005	0.113 ± 0.04*	0.01 ± 0.01*	0.055 ± 0.01*

VMP: Valor máximo Permitido em mg/L. nd: Valor não detectado. (\*) Não atendimento aos padrões de qualidade de água das leis brasileiras - CONAMA 357/05.

### 3.2 Ensaio Cometa

A análise por variância entre os períodos de seca e chuva revelou que os mesmos diferem em relação ao ID ( $p = 0,004$ ) e FD ( $p = 0,001$ ), apresentando maiores médias para os períodos de seca. Os resultados por ponto mostraram que tanto o controle negativo utilizado (açude de Bocaina) e como o P1 (ponto antes da cidade) não apresentaram valores significativos de dano genético para as células sanguíneas de *Oreochromis niloticus* independente do período analisado. Já as amostras de água dos pontos dentro da cidade (P2 a P4) e depois da cidade (P5) para os períodos de seca (2013/2014) foram genotóxicas ( $p < 0,001$ ) quando comparadas ao CN e P1, locais com valores aceitáveis da qualidade de água. Já para os períodos chuvosos (2014/2015), os pontos P2 a P5 apresentaram-se genotóxicos em pelo menos um período chuvoso analisado (Tabela 04).

Tabela 4: Nível de dano de DNA medido por ensaio cometa (Média  $\pm$  Desvio padrão) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos a amostras de água do rio Guaribas (Picos-PI/Brasil).

Ponto	Período / ano			
	Seco / 2013		Seco / 2014	
	ID	FD	ID	FD
CN	43,6 $\pm$ 6,8	27,5 $\pm$ 3,6	32,6 $\pm$ 7,8	23,3 $\pm$ 4,3
P1	47,6 $\pm$ 8,8	28,4 $\pm$ 6,3	39,8 $\pm$ 6,3	26,8 $\pm$ 3,2
P2	94,2 $\pm$ 8,4 a***	61,3 $\pm$ 11,6 a***	85,3 $\pm$ 12,8 a***	50,4 $\pm$ 4,7 a***
P3	106,1 $\pm$ 15,2 a***	71,6 $\pm$ 8,4 a***	108,2 $\pm$ 6,7 a***	65,1 $\pm$ 4,5 a***
P4	123,5 $\pm$ 8,6 a***	77,3 $\pm$ 4,8 a***	100,3 $\pm$ 6,1 a***	65,8 $\pm$ 8,1 a***
P5	95,4 $\pm$ 7,1 a***	62,5 $\pm$ 3,5 a***	82,4 $\pm$ 7,7 a***	55,6 $\pm$ 5,1 a***
CP	141,1 $\pm$ 10,1 a***	78,2 $\pm$ 4,7 a***	128,1 $\pm$ 12,4 a***	80,4 $\pm$ 5,5 a***
	Chuvoso / 2014		Chuvoso / 2015	
	ID	FD	ID	FD
	CN	28,3 $\pm$ 6,5	19,8 $\pm$ 6,8	35,1 $\pm$ 9,2
P1	42,1 $\pm$ 6,3	28,3 $\pm$ 3,5	48,5 $\pm$ 7,1	32,8 $\pm$ 5,6
P2	57,2 $\pm$ 8,1***	38,5 $\pm$ 8,1***	53 $\pm$ 6,4	35,4 $\pm$ 6,6
P3	89,6 $\pm$ 7,1 a***	53 $\pm$ 3,7 a***	92,5 $\pm$ 11,1 a***	53,1 $\pm$ 7,1 a***
P4	41,4 $\pm$ 4,1	24,3 $\pm$ 3,1	75,8 $\pm$ 10,7 a***	52,7 $\pm$ 5,4 a***
P5	49,6 $\pm$ 6,8	32,7 $\pm$ 2,2	69,7 $\pm$ 6,1 ***	47,2 $\pm$ 4,5 ***
CP	128,8 $\pm$ 9,2 a***	72,7 $\pm$ 5,8 a***	116,6 $\pm$ 10,3 a***	70 $\pm$ 7,7 a***

CN: Controle negativo, CP: Controle positivo (ciclofosfamida a 0,009 mg/ml), ID: Índice de dano, FD: Frequência de dano. ANOVA seguido de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ : estatisticamente significativa quando comparado com o CN. <sup>a</sup>: Estatisticamente significativa quando comparado com o P1 (antes da cidade).

A presença de metais em amostras de água e de solo superiores aos permitidos pelos órgãos reguladores ambientais é um forte indicador de atividades antrópicas (Mendiguchia et al., 2007; Netto et al., 2013). No presente estudo os níveis de sete diferentes metais foram quantificados. Os resultados obtidos mostraram níveis excessivos de Ferro, Zn, Cu,

Cr e Al em períodos de amostragem diferentes nos pontos P2 a P5 onde o efeito genotóxico foi significativo. Devido à sua estabilidade e persistência, a presença destes contaminantes na água constitui uma ameaça grave para os organismos que vivem no ambiente e para a população que entra em contato com água. Os metais pesados são agentes tóxicos conhecidos por causarem danos no DNA e serem cancerígenos (Bianchi et al., 2011; Korpinen et al., 2012).

De acordo com Hendozko et al (2010), o ensaio cometa é um biomarcador de genotoxicidade sensível e de confiança para o monitoramento aquático. Dhawan et al. (2009) relataram que este teste é recomendado para o rastreamento de uma mistura complexa de contaminantes químicos em estudos de biomonitoramento, inclusive para metais pesados. As análises realizadas pelo ensaio cometa, nos quatro períodos analisados para os pontos dentro (P2 a P4) e depois da cidade de Picos-PI/Brasil (P5) detectaram alterações significativas nos níveis de quebras de DNA de *O. niloticus*. Rank et al. (2005) encontraram correlações positivas entre os níveis de níquel e cromo nos sedimentos e danos no DNA de mexilhões coletados em áreas costeiras e submetidos a resíduos urbanos e industriais. Em um estudo realizado por Matsumoto et al. (2006), um aumento significativo foi observado nos níveis de quebras de DNA em células de sangue periférico de *O. niloticus* expostas a amostras de água contendo cromo.

Além do cromo, estudos genotóxicos com o Al também foram realizados por Achary et al. (2008), no qual relataram o efeito do Al como indutor de danos ao DNA através do ensaio cometa e o teste de *Allium cepa*. O Al constitui um dos maiores poluentes dos solos e águas, podendo ser transferido via teia alimentar e causar sérios problemas aos ecossistemas e à saúde humana (Krewski et al., 2007). Os estudos de Yabe e Oliveira (1998) relacionaram elevadas concentrações de alumínio à presença de danos no DNA dos eritrócitos de *Tilapia rendalli*. O Alumínio interfere na cinética de divisão celular, promovendo aderência cromossômica e fragmentação nuclear (Duarte et al., 2012). Já os metais Cu e Zn mostraram-se genotóxicos nos estudos de Siddiqui et al. (2011) e Kank et al. (2014) que observaram uma correlação positiva entre concentração de metais e potencial genotóxico. No presente estudo, observou também uma correlação positiva ( $p = 0,0001$ ;  $r = 0,60$  para o período chuvoso e  $p = 0,001$ ;  $r = 0,670$  para o período seco) entre metais conjugados e Índice de Dano (ID) (Figura 02).



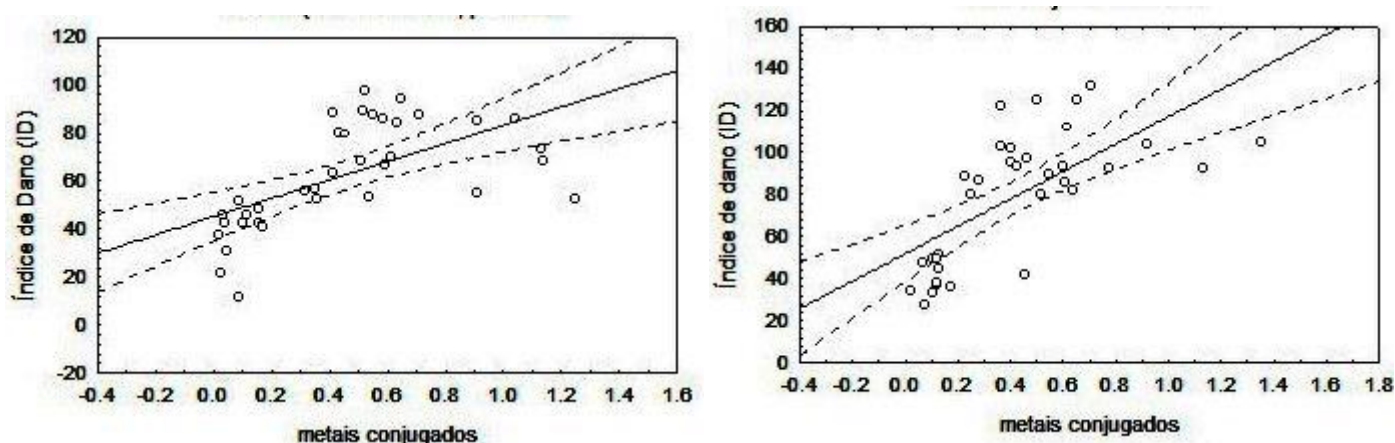


Figura 2: Correlação entre metais pesados conjugados e índice de danos (ID) em períodos de chuva e de seca.

Metais pesados encontrados no presente estudo como também outros poluentes químicos são considerados responsáveis por danos ao DNA (adutos de DNA, modificações de bases, quebras de fitas de DNA) quando presentes em efluentes domésticos e industriais (Fátima e Ahmad, 2006; Caritá e Marin-Morales, 2008). De acordo com Glińska et al. (2007) o aumento da genotoxicidade pode estar relacionado com distúrbios no ciclo celular e disjunção da cromatina induzidos pelas interações metais-DNA dentro da célula. As temperaturas elevadas mantidas em laboratório nas amostras de água ( $29 \pm 2^\circ\text{C}$ ), típicas da espécie estudada, pode ter relação com essa interação já que facilita a entrada de metais dissolvidos na água para dentro da célula, uma vez que o aumento da temperatura torna a membrana celular mais permeável a alguns compostos químicos (Phelps et al., 1999).

Outra possível explicação relacionando os efeitos genotóxicos nas amostras de água encontrados dentro e depois da cidade de Picos-PI/Brasil com a presença elevada de metais pode estar no fato de que metais pesados no ambiente aquático são geradores de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Chakraborty et al., 2009). Os ROS são responsáveis por vários tipos de fragmentação do DNA, sendo todos detectados por meio do ensaio cometa. Esses valores elevados de metais em pontos dentro da cidade de Picos estão possivelmente relacionados com a presença de lixo doméstico (pilhas, baterias, TVs, peças de carros) como também entrada de efluentes provenientes da ação antrópica tais como a presença de mecânicas e lavadores de carros presentes nas margens do rio durante todo o ano, além da utilização de pesticidas contendo metais na sua composição já que é um rio muito utilizado para agricultura.

Portanto, o aumento da atividade clastogênica detectado pelo ensaio cometa nas células sanguíneas de *O. niloticus* no presente estudo pode ser devido a presença de níveis

alterados de metais pesados, como o Zn, Cu, Cr e Al, atuando em conjunto nos períodos analisados, como também por outros tipos de contaminantes mutagênicos não investigados como a presença de cianotoxinas genotóxicas e carcinogênicas (microcistinas e nodularinas) liberadas por florações de espécies de cianobactérias presentes em ambientes eutrofizados como o rio Guaribas e a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), ou a mistura de todos esses contaminantes genotóxicos e mutagênicos que em sinergismo causam alterações na estrutura do DNA nos organismos que vivem nesse tipo de ambiente e na população que utiliza a água do rio.

Assim, como é o primeiro biomonitoramento genético realizado no ambiente estudado que se tem conhecimento na literatura, se faz necessários estudos adicionais genotoxicológicos utilizando outros bioensaios (teste *Allium cepa*, Teste de Micronúcleos) como também a detecção de outros contaminantes mutagênicos presentes não somente na água, mas também nos sedimentos do rio Guaribas.

#### **4 CONCLUSAO**

Feito o biomonitoramento físico-químico e genotóxico do ambiente aquático estudado, observou-se que o rio Guaribas (Picos-PI/Brasil) está com suas águas impactadas nos trechos dentro e depois da cidade de Picos apresentando um elevado estado de eutrofização ocasionado pela ação antropogênica. Ademais essa mesma ação provocou a liberação de mutagênicos químicos na água, como metais pesados, que causaram danos ao DNA das células sanguíneas de *O. niloticus*. Assim, a principal cidade a margem do rio Guaribas vem ocasionando, nos últimos anos, a diminuição da qualidade da água do rio como também modificações genéticas nos organismos desse ecossistema, sendo recomendado assim, estabelecer programas de monitoramento para minimizar a degradação ambiental atualmente presente e detectar a presença de outros agentes genotóxicos no rio Guaribas.

## REFERÊNCIAS

- Achary, V.M.M., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B. 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 300-310.
- Akinboro, A., Mohammed, K., Rathnasamy, S., & Muniandy, V.R. (2011). Genotoxicity Assessment of Water Samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, Using the *Allium cepa* Test. *Tropical Life Sciences Research* 22, 23–35.
- Amr, S.S.A., Yassin, M.M. 2008. Microbial contamination of the drinking water distribution system and its impact on human. *Public Health*, 122, 1275-1283.
- Andrade-Júnior, A.S., Silva, E.F.F. S., Bastos, E.A., Melo, F.B; Leal, C. M. 2006. Use and quality of groundwater for irrigation in semi-arid region of the Piauí State, Brazil. *Journal of Agricultural and Environmental Engineering*, 10, 873-880.
- APHA, AWWA, WPCF. *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*. 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC; 2005.
- Azevedo, F.A.; Chasin, A.A.M.; *As Bases toxicológicas da Ecotoxicologia*. Rima, São Carlos and Intertox, São Paulo, 2004.
- Barbosa, J.S., Cabral T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo de Medeiros, S.R. 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320-325.
- Barbosa, M. P., Neto, J. M. M., Fernandes, M. F. & Silva, M. J. **Estudo da degradação das terras – municipais de Picos – PI XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Anais Florianópolis, Brasil, INPE, p. 4357- 4363.
- Barsiene, J., Butrimaviciene, L., Michailovas, A., Grygiel, W. (2015) Assessing the environmental genotoxicity risk in the Baltic Sea: frequencies of nuclear buds in blood erythrocytes of three native fish species. *Environ. Monit. Assess.*, 187, 4078-4089.
- Bianchi, J., Espindola, E.L.G., Marin-Morales, M. A. 2011. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 826–833.
- Birungi, Z., Masola, B., Zaranyika, M.F., Naigaga, I., Marshall, B. 2007. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case os Nakiubo wetland along Lake Victoria. *Physics and Chemistry of the Earth*, 32, 1350-1358.
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P. S., Hollert, H., Braunbeck, T. 2010. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 700, 11–17.

Bolognesi, C., Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26, 205-213.

Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, E. G., Agurell S. Y., Brendler-Schwaab et al. 2007. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: Results of the in vivo comet assay workgroup. *Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, 627, 31-35.

Caritá, R., Marin-Morales, M. A. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72, 722–735.

Cerda, H., Delincée, H., Haine, H., Rupp, H. (1997). The DNA “comet assay” as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Research*, 375, 167– 181.

Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A. (2009) Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ Pollut.*, **157**, 3025–3033.

CETESB—Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 2005. Ano 2004: Relatório da qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, SP.

Chakraborty, R., Mukherjee, A., Mukherjee, A. 2009. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. *Environ. Monit. Assess*, 153, 151–157.

Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications and limitations. *Mol. Biotechnol*, 26, 249-261.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf) (Acessado 15/04/2015).

Cukrov, N., Tepic, N., Omanović, D., Logen, S., Bura-Nakić, S., Vojvodic, E., et al. 2012. Qualitative interpretation of physico-chemical and isotopic parameters in the Krka River (Croatia) assessed by multivariate statistical analysis. *Int. J. Environ. Anal Chem.* 92 (10), 1187–1199.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 5–32.

Duarte, I. D., Dias, M. C., David, J. A. O., Matsumoto, J. S. 2012. A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. *R. bras. Biociências*, 10, 211-219.

Düsman, E., Luzzi, M., Savegnago, L., Lauxen, D., Vicentini, V.E.P., Tonial, I.B., Sauer, T.P. 2014. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. *Environ Monit Assess*, 186, 1793–1800.

- Eissa, B.L., Ossana, N.A., Ferrari, L., Salibian, A. (2009) Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 1032–1039.
- Erbe, M.C.L, Ramsdorf, W.A., Vicari, T., & Cestari, M.M. (2011). Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 20, 320–328.
- Erdtmann, B. Genética Toxicológica. In: Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P.; Silva, J. 2003. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, p.28-35.
- Ergene, S., Cavas, T., Celik, A., Koleli, N., & Aymak, C., (2007). Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environment. Molecular. Mutagen.* **48**, 421–429.
- Esteves, F. A. 2011. Fundamentos de Limnologia. 3ª Ed. Editora Interciência. Rio de Janeiro.
- Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Priydun, C.V., Stoliar, O.B., Nam, Y.K. (2010) Variability of responses in the crucian carp *Carassius carassius* from two Ukrainian ponds determined by multi-marker approach. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **73**, 1896–1906.
- Filho, J. S .S. & Gomes, J. M. A. 2004. *Indicadores de bem-estar social nos municípios da bacia hidrográfica do Rio Guaribas – Piauí*. Picos, Piauí.
- Freitas, M. A. S. 2002. *Usos múltiplos da água na bacia hidrográfica do Rio Guaribas (estado do piauí)*. Picos, Piauí.
- Farmer, P. B., Singh, R. 2008. Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: the increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens. *Mutation Research*, **659**, 68–76.
- Fatima, R. A., Ahmad, M. 2006. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays. *Mutation Research*, **609**, 81–91.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, **681**, 80–92.
- Glińska, S., Bartczak, M., Oleksiaka, S., Wolska, A., Gabara, B., Posmyk, M., et al. 2007. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. *Ecotoxicol Environ Safety*, **68**, 343–50.
- Goulart, M.D.C., Callisto, M. 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, **1**, 1-9.

Hartmann, A., Elhajouji, E., Kiskinis, F., Poetter, H., et al. 2003. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening: Comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 843-858.

Hendozko, E., Szefer, P., Warzocha, J. 2010. Heavy metals in *Macoma balthica* and extractable metals in sediments from the southern Baltic Sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 152e163.

Hinton, D.E.; Kullman, S.W.; Hardman, R.C.; Volz, D.C.; Chen, P.J.; Carney, M.; & Bencic, D.C.; Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin*, 2005.

Hu, J., Qiao, Y., Zhou, L., Li, S., 2011. Spatiotemporal distributions of nutrients in the downstream from Gezhouba Dam in Yangtze River, China. *Environ Sci. Pollut. Res* 19, 2849–2859.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia, 2015. Dados meteorológicos. Disponível em: < <http://www.inmet.gov.br/> > (Acessado 12/03/2015).

Kang, N., Kang, H., An, K. G. 2014. Analysis of fish DNA biomarkers as a molecular-level approach for ecological health assessments in an urban stream. *Bull Environ Contam Toxicol*, 93:555–560.

Kazi, T.G., Arain, M.B., Jamali, M.K., Jalbani, N., Afridi, H.I., Sarfraz, R.A., Baig, J.A., Shah, A.Q. 2009. Assessment of water quality of polluted lake using multivariate statistical techniques: A case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 301– 309.

Kern, D.I., Schwaickhardt, R.O., Lutterbeck, C.A., Kist, L.T. Alcayaga, E.A.L., & Machado, E.L., (2015). Ecotoxicological and Genotoxic Assessment of Hospital Laundry Wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol*. 68, 64–73.

Klauck, C.R., Rodrigues, M.A.R., & Silva, L.B. (2013). Toxicological evaluation of landfill leachate using plant (*Allium cepa*) and fish (*Leporinus obtusidens*) bioassays. *Waste Management and Research* 31, 1148–1153.

Klobucar, G. I. V., Malev, O., Srut, M., Štambuk, A. N., Lorenzon, S., Cvetkovic, Z., Ferrero, E. A., Maguire, I. 2012. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Chemosphere*, 87, 62–67.

Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A. M. Rondeau, V. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 10, 1-269.

Korpinen, S., Meski, L., Andersen, J.H., Laamanen, M. 2012. Human pressures and their potential impact on the Baltic Sea ecosystem. *Ecol. Indic.* 15, 105-114.

Leme, D. M., Marin-Morales, M. A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*, 682, 71–81.

Lemos, C.T.; & Terra, N.R.; Poluição – Causas, Efeitos e Controle. In: Silva, J.; Erdtmann, B.; & Henriques, J.A.P.; *Genética Toxicológica. Alcance*, 2003.

Magdeburg, A., Stalter, D., Schlüsener, M., Ternes, T., Oehlmann, J. (2014) Evaluating the efficiency of advanced wastewater treatment: Target analysis of organic contaminants and (geno)toxicity assessment tell a different story. *Water research*, **50**, 35 – 47.

Manzano. B. C., Roberto, M. M., Hoshina, M. M., Menegário, A. A., Marin-Morales, M.A. 2015. Evaluation of the genotoxicity of water impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. *Environ Sci Pollut Res*, **22**,1399–1407.

Marcon, A. E., Ferreira, D. M. F., Moura, M. F. V., Campos, T. F. C., Amaral, V. S., Agnez-Lima, L.F., Medeiros, S. R. B. 2010. Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. *Chemosphere*, **81**, 773–780.

Marinelli, C. E., Moretto, E. M., Brucha, G., Lucca, J. V. 2000. *Limnologia: A Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho*. Rima, São Carlos.

Masood, F., & Malik, A. (2013). Mutagenicity and genotoxicity assessment of industrial wastewaters. *Environment Science Pollution Research*. **20**, 7386–7397.

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

Mazzeo D. E. C, Matsumoto S. T, Levy C. E., Angelis, D. F., Marin-Morales, M. A. 2013. Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. *Chemosphere*, **90**, 1030-1036.

Mendiguchia, C., Moreno, C., Garcia-Vargas, M. 2007. Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients. *Chemosphere*, **69**, 1509–1517.

Mihara, N., Soya, K., Kuchar, D., Fukuta, T., Matsuda, H., 2008. Utilization of calcium sulfide derived from waste gypsum board for metal-containing wastewater treatment. *Global NEST J*. **10**, 101–107.

Mihaljevic, Z., Ternjej, I., Stankovic, I., Ivkovic, M., Zeljezic, D., Mladinic, M., Kopjar, N. 2011. Assessment of genotoxic potency of sulfate-rich surface waters on medicinal leech and human leukocytes using different versions of the Comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**, 1416–1426.

Moraes, D. S. L. 2000. *Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de Allium cepa*. 2000. 158 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Muangthong, S., Shrestha, S., 2015. Assessment of surface water quality using multivariate



statistical techniques: case study of the Nampong River and Songkhram River, Thailand. *Environ Monit Assess.* 187, 548.

Neta, R. N. F. C., Sousa, D. B. P., Sobrinho, I. C. M., Horton, E. Y., Almeida, Z. S., Tchaicka, L., Sousa, A. L. (2014) Genotoxic and hematological parameters in *Colossoma macropomum* (Pisces, Serrasalminidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protect area in northeastern Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1-10.

Netto, E. R.A. Madeira, F.Z. Silveira, M.A. Fiori, E. Angioleto, C.T. Pich, R. Geremias. 2013. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of acid mine drainage using physicochemical parameters and bioassays. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35, 511-516.

Nunes, E. A., Lemos, C. T., Gavronski, L., Moreira, T. N., Oliveira, N. C. D., Silva, J. (2011) Genotoxic assessment on river water using different biological systems. *Chemosphe*, **84**, 47–53.

Ohe, T.; Watamabe, T.; & Wakabayashi, K.; Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 2004.

Osman, A., Ali, E., Hashem, M., Mostafa, M. Mekki, I. 2010. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoosporic fungi (*Achlya klebsiana* and *Aphanomyces laevis*) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 24-31.

Ossana, N. A., Castane, P. M., Salibian, A. 2013. Use of *Lithobates catesbeianus* Tadpoles in a Multiple Biomarker Approach for the Assessment of Water Quality of the Reconquista River (Argentina). *Arch Environ Contam Toxicol*, 65, 486–497.

Plano de Ação para o Desenvolvimento Integrado da Bacia do Parnaíba, PLANAP: síntese executiva: Território Vale do Rio Guaribas / Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba – CODEVASF. – Brasília, DF: TDA Desenhos e Arte Ltda., 2014.

Pavlica, M.; Besendorfer. V.; Rosa, J.; & Paes, D.; The citotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*). *Chemosphere*, 2000.

Phelps, M.J., Benson, J.D., Willoughby, C.E., Gilmore, J.A., Critser, J.K., 1999. Effects of percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristic of *Murine Spermatozoa* and their relevance to cryopreservation. *Biol. Reprod.* 61, 1031–1041

Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F. & Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental*. 1 ed. Brasil: ULBRA, 2003. 355p.

Rice, E. W. et al. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, *Water Environment Federation*, 22.



- Rank, J., Jensen, K., Jespersen, P.H., 2005. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat. Res.* 585, 33–42.
- Rocha, P. S., Luvizotto, J. L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T. Hollert, H. 2009. Sediment genotoxicity in the Tiete River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1842-1848.
- Santos, M. S.. 2009. *Bacia hidrográfica do Rio Guaribas, Piauí: Aspecto da Geomorfologia Fluvial*. IX Simpósio Nacional de Geomorfologia, Rio de Janeiro.
- Sharma, P., Mathur, N., Singh, A., Sogani, M., Bhatnagar, P., atri, R., Pareek, S. (2015) Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity and mutagenicity. *Environ. Monit. Assess.* **187**, 4180-4193.
- Siddiqui, A. H., Tabrez, S., Ahmad, M. 2011. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. *Environ Monit Assess*, 179, 241–253.
- Singh, N. P.; Mccoy, M. T.; Tice, R. R.; Scheider, E. L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Tobiszewski, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., Namiesnik, J., 2010. Surface water quality assessment by the use of combination of multivariate statistical classification and expert information. *Chemosphere* 80 (7), 740–746.
- Tsangaris, C., Vergolyas, M., Fountoulaki, E., & Goncharuk, V.V. (2011). Genotoxicity and oxidative stress biomarkers in *Carassius gibelio* as endpoints for toxicity testing of Ukrainian polluted river waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 2240–2244.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Colus, I.M.S. (2007) Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631, 36–43.
- Veloso, R. L., Deus, M. S. M., Peron, A.P., Gonçalves, N. M. N. 2014. Plantas aquáticas: conhecimento de alunos do ensino médio da rede Pública de ensino sobre sua proliferação no rio Guaribas, Picos – PI. *Ambiência*, 10, 363 – 378.
- Vincent-Hubert, F., Heas-Moisan, K., Munsch, C., Tronczynski, J. 2012. Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river estuary. *Mutation Research*, 741, 7– 12.
- Umbuzeiro, G.A.& Roubicek, D.A.; Genotoxicidade Ambiental. In: Zagato, P. A .& Bertoletti, E. 2003. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima, p. 327-344.
- WETSEL, R. G. 2001. *Limnology: Lake and river ecosystems*. Therth ed. Academic Press San Diego.
- Whitfield, J. 2001. Vital signs. *Nature*. 28, 989-990.

Yabe, M. I. S. Oliveira, E.O. 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Química Nova*, 21, 551-5.

## ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
 Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 19 de Dezembro de 2014.

Ilmo.

**Prof. Dr. HORÁCIO FERREIRA JÚLIO JUNIOR.**  
**Departamento: Biologia/ CCN/ UFPI.**

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (19 de Dezembro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **108/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Biomonitoramento das águas da Bacia hidrográfica do Rio Guaribas (Picos- PI/BRASIL) por meio de testes de toxicidade em sistema teste animal e vegetal**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Janeiro/2015 à Dezembro/2015, e serão usados 42 Peixes (Machos e Fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

  
**Prof. Ivete L. de Mendonça**  
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
 Coordenadora

## ANEXO B - Instruções para submissão de trabalho da revista *Monitoring & Environmental Assessment*.

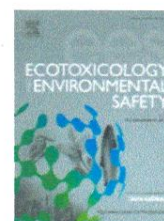


### ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>



ISSN: 0147-6513

#### DESCRIPTION

*Ecotoxicology and Environmental Safety* focuses on integrated mechanistic research related to short- and long-term pathways and interactions of substances and chemical mixtures in environmental systems and subsystems on their bioavailability, and assimilation in organisms, as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); and on their subsequent fate in the environment, food chain, including humans. Novel technologies, techniques, and methods such as biomarkers, biosensors and bioanalytical systems, bioremediation methods, QSARs and QSPRs, advanced high performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing interdisciplinary ecotoxicological information are also addressed in the journal. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. Emphasis is placed on ecological animal models rather than laboratory based rodent studies; The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. The journal publishes regular research articles, and review articles.

#### IMPACT FACTOR

2014: 2.762 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

#### ABSTRACTING AND INDEXING

MEDLINE®  
SIIC Data Bases

#### EDITORIAL BOARD

**Editor:**

**K. Kannan**, State University of New York (SUNY) at Albany, Albany, New York, USA

**Associate Editors:**

**R. Handy**, Plymouth University, Plymouth, UK

**P. Sibley**, University of Guelph, Ontario, Ontario, Canada

***Emeritus Editor:***

**F. Korte**, Technische Universität München, Attenkirchen, Germany

***Editorial Board:***

**S.B. Agrawal**, Banaras Hindu University, Varanasi, India

**J. Chen**, Dalian University of Technology, Dalian, China

**S. Degitz**, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Duluth, Minnesota, USA

**S.J.S. Flora**, Ministry of Defence, Government of India, Gwalior, India

**H. Greim**, Technische Universität München, München, Germany

**M. Hecker**, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

**R.A. Hoke**, DuPont Company, Newark, Delaware, USA

**T. Iguchi**, National Institute for Basic Biology (NIBB), Okazaki Aichi, Japan

**H. Iwata**, Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan

**D. Johnson**, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA

**R. Kookana**, CSIRO (The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), Glen Osmond, South Australia, Australia

**Y.-F. Li**, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, China

**L.Q. Ma**, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

**A. Miracle**, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington, USA

**H.-B. Moon**, Hanyang University, Ansan, South Korea

**H. Nakata**, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

**J. Newsted**, ENTRIX Inc, Okemos, Michigan, USA

**S. Shaw**, Marine Environment Research Institute (MERI), Blue Hill, Maine, USA

**L.A. Tremblay**, Manaaki Whenua Landcare Research, Lincoln, New Zealand

**C.A.M. van Gestel**, VU University, Amsterdam, Netherlands

**P. Vasseur**, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Metz, France

**M. Vighi**, Università degli Studi di Milano, MILAN, Italy

**W-X. Wang**, Hong Kong University of Science & Technology, Kowloon, Hong Kong

**P.-K. Wong**, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

### INTRODUCTION

*Ecotoxicology and Environmental Safety* focuses on integrated mechanistic research related to short- and long-term pathways and interactions of toxic substances and chemical mixtures in environmental systems with emphasis on their bioavailability, assimilation and metabolism in target organisms as well as biological responses of these organisms, and damage mechanisms (endocrine disruption, genotoxicity); fates of toxicants in the food chain, including exposures in humans are considered.. The journal prefers interdisciplinary studies of environmental chemistry and toxicology describing environmental fate and biological fate of pollutants, novel analytical technologies, techniques, and methods such as biomedical photonic technologies, biomarkers, biosensors, bioanalytical systems, QSARs, QSPRs, advanced high-performance computational methods, models, and their applications in obtaining and processing ecotoxicological information. We welcome the applied outcome of complex ecotoxicological research such as developing the science-based Environmental Quality Criteria (EQC), standard toxicity tests, techniques, and methods for ecotoxicological evaluation of the environment, as well as developing ecotoxicologically proven methods and technologies for prevention, interception, and remediation of human-induced damage to ecosystems. The above scope of the journal is aimed at providing science-based tools for sustainably managing the environment through risk assessment, risk characterization, risk prediction, and risk management. Emphasis will be placed on ecotoxicological animal model studies (rather than rodent models) as well as field studies (rather than controlled laboratory investigations) dealing with fate and effects of pollutants.

**In dose-response studies, nominal exposure concentrations of substances not proved by measurements are in general not accepted in EESA, and such manuscripts are being rejected outright.** In other words, in experiments dealing with animal exposures, the exposure regimen/concentrations should be environmentally relevant.

### *Types of paper*

The journal publishes regular research articles. Regular research articles must not exceed 8,000 words. Word limit here is for text only. In principle the number of tables and figures should not collectively exceed six. Any exceptions should require approval from editors. Review articles are welcome, but authors are requested to contact the editors for prior approval.

Authors may provide supporting information (for manuscripts exceeding the recommended length), and this material will be made available online.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

Ethical statement concerning human and animal subjects is mandatory. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### *Conflict of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

#### *Submission declaration and verification*

***Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of***

*an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsib*



authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**



- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

### Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in.

This journal has an embargo period of 24 months.

### *Language and language services*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. The values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. Ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm.

### *Submission*

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ees/>.

If you have difficulty with your submission or any other questions, please contact the Editorial Office:

*Ecotoxicology and Environmental Safety*

Editorial Office

525

B

Street,

Suite

180

San Diego, CA 92101-4495, USA

Telephone: (619) 699-6297

Fax: (619) 699-6850

E-mail: ees2@elsevier.com

### *Referees*

All submitted manuscripts must include a list of five suggested reviewers. Please include the names and contact information (including email addresses) for 5 reviewer suggestions. Typically three of these should be from countries other than those of the authors. Please note that this is a mandatory element of your submission and the Editorial Office cannot locate reviewers on your behalf. If you are unable to suggest potential experts in the field, please refer to your references for possible reviewers.

### *Additional information*

Each manuscript should be accompanied by a letter outlining the basic findings of the paper and their significance.

## **PREPARATION**

### *NEW SUBMISSIONS*

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

## **REVISED SUBMISSIONS**

Use double spacing. All pages must be numbered, beginning with the abstract. All lines must be numbered, preferably continuously throughout the entire manuscript.

### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

## Article structure

### Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### Material and methods

*Materials and methods* should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. It is mandatory to give formal assurance that any study involving humans or experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the *protection of human subjects and animal welfare*. No manuscript will be considered unless this information is supplied.

### Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

## Results/Discussion

Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a

separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Specially please note, the values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in  $\times g$ , not rpm.

### **Math formulae**

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### **Artwork**    *Electronic* *artwork*    *General* *points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Text graphics*

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

#### **References Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

All citations in the text should refer to:

*Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; *Two authors:* both authors' names and the year of publication; *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/ecotoxicology-and-environmental-safety>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### **Reference style**

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.



*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

### *Video data*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### *AudioSlides*

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### *Supplementary material*

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### *Database linking*

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### *Interactive plots*

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <http://www.elsevier.com/interactiveplots>.

### *Submission checklist*

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alphanumeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### *Online proof correction*

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### *Offprints*

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

## AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA  
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

**Identificação do Tipo de Documento**

- ( ) Tese  
( ) Dissertação  
(  ) Monografia  
( ) Artigo

Eu, Ana Elvilde Ramos,  
autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de  
02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,  
gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação  
Análises físicas, Químicas e Genotóxicas em um  
rio tropical (Brasil) sob a influência da ação Antropogênica.  
de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título  
de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 23 de Março de 2017.

Ana Elvilde Ramos

Assinatura