

**Marcos Vinícius Mocellin Ferraro**

**AVALIAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DE PEIXES – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, COMO POTENCIAIS BIOINDICADORES EM SISTEMAS HÍDRICOS ATRAVÉS DOS ENSAIOS: COMETA E DOS MICRONÚCLEOS**

**Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas área de concentração Genética.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Margarete Cestari.**

**Curitiba  
Fevereiro de 2009**



*Àqueles a quem devo e devoto minha  
peregrinação terrena:*

*meus pais:*

***Nélson e Aracy.***

*meus filhos:*

***Otávio Augusto, Caio César e Luiza Helena.***

*minha companheira por muitos anos:*

***Maria Luiza.***

*meu mentor espiritual:*

***Dr. Leocádio José Corrêa***

## AGRADECIMENTOS

A todos os meus colegas de laboratório, pelo convívio, amizade e apoio quando necessário.

Aos professores do Departamento de Genética da UFPR pela paciência e competência na transmissão de seus conhecimentos.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Margarete, pelo carinho, atenção, apoio com o qual fui recebido e desfrutei durante estes anos.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade concedida para a minha formação.

Um agradecimento especial a Prof<sup>a</sup> Valéria, por sua amizade, pelas nossas conversas sobre filhos, filosofia, vida. Em resumo, uma pessoa que enriqueceu este tempo que passei junto a UFPR.

Ao Prof. Alberto Fenocchio, meu co-orientador durante o mestrado e grande amigo ao longo destes anos, suas críticas sempre foram e são construtivas.

Ao Prof Iglénir Cavalli meu grande ídolo como pessoa e professor desde os tempos da graduação.

O agradecimento que segue é para pessoas muito especiais, às quais, devo imensa gratidão. As palavras, que encontro para agradecer-lhes, são muito pequenas diante de tudo que eles representam na minha vida.

Aos meus filhos *Otávio Augusto, Caio César e Luiza Helena*, por terem compreendido e suportado um pai muitas vezes estressado.

A minha companheira e esposa *Maria Luiza*, pela força, coragem, empenho, determinação e fibra com que tentou superar nossos problemas completamente só. Que possa ser ainda a minha escolha.

Aos meus pais *Nelson e Aracy*, e ao meu irmão *César Luis* pelo carinho, atenção, apoio e paciência.

A todos eles, deixo registrado que esta conquista não é individual. É, na verdade o resultado de nossa união. Que ela esteja sempre presente em nossas vidas

*A Deus, que me dá mais do que mereço.*

*“É preciso compreender esse grande significado do corpo sem esquecer que o pensador é o espírito, o conhecedor é o espírito e que o agente de mudanças é o espírito.”*

Leocádio José Correia

## RESUMO

Estudos de genotoxicidade, especialmente aqueles envolvendo agrotóxicos ou seus compostos são de grande importância, especialmente em ambientes aquáticos onde eles tendem a se acumular. O uso de organismos aquáticos como sentinelas ambientais provou-se ser útil no monitoramento ambiental. Espécies nativas são ideais, no entanto seu uso requer padronização de metodologias para avaliar a extensão do dano no material genético. Três espécies de peixes que habitam sistemas de água doce do Brasil, jundiá – *Rhamdia quelem*, lambari – *Astyanax bimaculatus* e carpa *Cyprinus carpio*, foram avaliadas como potenciais bioindicadores em ensaios de biomonitoramento ambiental. Estas espécies foram avaliadas pelo Teste do Micronúcleo Písceo, pela contagem de Eritrócitos Policromáticos e pelo Ensaio Cometa. As espécies foram expostas a dois compostos comerciais Roundup® (1,58 mg/l e 3,16 mg/l), Folicur® (0,4 mg/l e 0,8 mg/l) e a mistura de ambos (3,16 mg/l e 0,8 mg/l) pelo período de cinco, dez e 15 dias para cada dosagem e para a mistura. Após a exposição foi coletado o sangue da veia caudal e os testes foram realizados. Nossos resultados indicam que as três espécies são bons bioindicadores, no entanto existe uma pequena vantagem para as espécies nativas. Também foi constatado o potencial genotóxico e citotóxico dos compostos comerciais. Notavelmente a mistura destes dois produtos revelou-se mais genotóxica e citotóxica do que os produtos isolados.

## ABSTRACT

Genotoxicity studies, specially those involving agrotoxics or their compounds are of great importance, specially in aquatic environments where they tend to accumulate. The use of aquatic organisms as environmental sentinels has proved very useful to environmental monitoring. Endemic organisms are the choice; nevertheless their use requires methodology standardization in order to evaluate the extent of damage of the genetic material. Three fish species inhabiting Brazilian freshwater ecosystems, Jundiá - *Rhamdia quelen*, Lambari - *Astyanax bimaculatus* (native species) and Carpa - *Cyprinus carpio* (exotic species), were evaluated for their use as biomarkers using Piscine Micronucleus Test, Polychromatic Erythrocytes and Comet Assay. Fishes were exposed by immersion to two commercial compounds: Roundup® (1,58 mg/l and 3,16 mg/l), Folicur® (0,4 mg/l and 0,8 mg/l) and the mixture of both (3,16 mg/l and 0,8 mg/l). Each species was exposed for 5, 10 and 15 days for each of the concentrations mentioned of the compounds. Furthermore, this compound was tested for its genotoxic and citotoxic potential on fish erythrocytes. After exposures fish blood was collected by caudal vein punctures. Our results point to the suitability of the three species for biomonitoring. Were too demonstrated de potential genotoxicity and cytotoxicity activity of the compounds. Notably, compounds mixture was more cytotoxicity and genotoxic.

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS ENTRE OS ANIMAIS EXPOSTOS E SEU CONTROLE.....	69
GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES UTILIZADAS COM O GRUPO CONTROLE AS DUAS CONCENTRAÇÕES DE FOLICUR, NOS TEMPOS DE 5, 10 E 15 DIAS. ....	71
GRÁFICO 3 – RESULTADOS DA EXPOSIÇÃO EM CONJUNTO DOS DOIS CONTAMINANTES COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.....	72
GRÁFICO 4 – MEDIANAS DOS MN E AMN RELATIVAS A EXPOSIÇÃO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE ROUNDUP® EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO. ..	80
GRÁFICO 5 – MEDIANAS DOS MN E AMN RELATIVAS A EXPOSIÇÃO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE FOLICUR®.....	82
GRÁFICO 6 – MEDIANAS DOS MN E AMN RELATIVAS À EXPOSIÇÃO DA MISTURA DE FOLICUR® E ROUNDUP® EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO.....	84
GRÁFICO 7 – MEDIANAS OBTIDAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA APÓS EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP®.....	88
GRÁFICO 8 – MEDIANAS OBTIDAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA APÓS EXPOSIÇÃO AO FOLICUR® .....	90
GRÁFICO 9 – MEDIANAS OBTIDAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA APÓS EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP® E FOLICUR®.....	92
GRÁFICO 10 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES EXPOSTAS AOS CONTAMINANTES E ANALISADAS PELO PERCENTUAL DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS. A COMPARAÇÃO FOI REALIZADA ENTRE AS TRES ESPÉCIES EXPOSTAS PELO MESMO PERÍODO AO MESMO CONTAMINANTE .....	103
GRÁFICO 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES EXPOSTAS AOS CONTAMINANTES E ANALISADAS PELO NÚMERO DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. A COMPARAÇÃO FOI REALIZADA ENTRE AS TRES ESPÉCIES EXPOSTAS PELO MESMO PERÍODO AO MESMO CONTAMINANTE.....	105
GRÁFICO 12 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES EXPOSTAS AOS CONTAMINANTES E ANALISADAS PELOS ENSAIO COMETA. A COMPARAÇÃO FOI REALIZADA ENTRE AS TRÊS ESPÉCIES EXPOSTAS PELO MESMO PERÍODO AO MESMO CONTAMINANTE .....	107



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AS SETAS INDICAM ERITRÓCITOS DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. CÉLULAS CORADAS COM LARANJA DE ACRIDINA. (1000X).....	34
FIGURA 2 – ERITRÓCITOS DE <i>CYPRINUS CARPIO</i> (A) E <i>RHAMDIA QUELEN</i> (B). OS NÚMEROS NAS FOTOS A E B INDICAM A CLASSE DE DANO DE CADA UMA DAS CÉLULAS (NUCLEÓIDES).....	38
FIGURA 3 – EXEMPLAR DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> .....	47
FIGURA 4 – EXEMPLAR DE <i>ASTYANAX BIMACULATUS</i> .....	48
FIGURA 5 – EXEMPLAR DE <i>CYPRINUS CARPIO</i> .....	49
FIGURA 6 – TANQUES DE 250 LITROS UTILIZADOS NA ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS. ....	55
FIGURA 7 – UM DOS AQUÁRIOS DE 100 LITROS ONDE FORAM EXPOSTOS OS PEIXES AOS XENOBIONTES. ....	56
FIGURA 8 – A FOTO MOSTRA O PONTO JUNTO A NADADEIRA ANAL DE ONDE FOI COLHIDO O SANGUE PARA OS ENSAIOS. ....	59
FIGURA 9 – ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICO E POLICROMÁTICOS DE <i>RHANDIA QUELEN</i> . OS POLICROMÁTICOS APRESENTAM CITOPLASMA VERMELHO (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA – 1000X) .....	67
FIGURA 10 – A SETA INDICA ERITRÓCITO POLICROMÁTICO DE <i>RHANDIA QUELEN</i> APRESENTANDO ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA NUCLEAR (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA – 1000X).....	67
FIGURA 11 - ERITRÓCITOS DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA - 1000X).....	75
FIGURA 12 - - ERITRÓCITOS DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> . A SETA INDICA CÉLULA COM DOIS MICRONÚCLEOS. (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA - 1000X) .....	75
FIGURA 13 – A SETA INDICA ERITRÓCITO DE <i>ASTYANAX BIMACULATUS</i> COM MICRONÚCLEO (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X) .....	76
FIGURA 14 – SETA INDICANDO ERITRÓCITO DE <i>ASTYANAX BIMACULATUS</i> COM MICRONÚCLEO (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X) .....	76
FIGURA 15 - AS SETAS INDICAM ALGUNS ERITRÓCITOS DE <i>ASTYANAX BIMACULATUS</i> APRESENTANDO ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X) .....	77
FIGURA 16 - AS SETAS INDICAM ALGUNS ERITRÓCITOS DE <i>ASTYANAX BIMACULATUS</i> APRESENTANDO ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X).....	77

FIGURA 17 – COMETAS OBTIDOS DE SANGUE DE *ASTYANAX BIMACULATUS*. DIFERENTES CLASSES SÃO INDICADAS PELOS NÚMEROS NA FIGURA. (COLORAÇÃO BROMETO DE ETÍDEO – 1000X) .....85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MICRONÚCLEOS ESPONTÂNEOS ENCONTRADOS EM ERITRÓCITOS DE PEIXES (POR 1000 CÉLULAS) REGISTRADOS POR DIFERENTES AUTORES EM DIFERENTES ESPÉCIES.....	29
TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 1,58 MG/L.....	68
TABELA 3 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 3,16 MG/L.....	69
TABELA 4 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,4 MG/L.....	70
TABELA 5 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 MG/L.....	71
TABELA 6 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAAS ESPÉCIES EXPOSTAS A MISTURA DE FOLICUR® 0,8 MG/L E ROUNDUP® 3,16 MG/L.....	73
TABELA 7 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 1,58 MG/L.....	78
TABELA 8 - MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 3,16 MG/L.....	79
TABELA 9 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,4 MG/L ..	81
TABELA 10 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 MG/L ..	82
TABELA 11 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 MG/L E AO ROUNDUP® 3,16 MG/L.....	83
TABELA 12 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 1,58 MG/L.....	86
TABELA 13 – MÉDIAS E DESVIOS DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 3,16 MG/L.....	87
TABELA 14 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,4 MG/L.....	89
TABELA 15 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 MG/L.....	90
TABELA 16 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 MG/L E ROUNDUP® 3,16 MG/L ..	91

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 O PROBLEMA AMBIENTAL .....	1
1.2 BIOMARCADORES, BIOINDICADORES, BIOTRANSFORMAÇÃO E BIOMONITORAMENTO. ....	3
1.3 GENÉTICA TOXICOLÓGICA – GENOTOXICIDADE E MUTAÇÕES .....	5
1.4 ESCOLHA DOS BIOINDICADORES .....	7
1.5 AGROTÓXICOS OU DEFENSIVOS AGRÍCOLAS? .....	9
1.6 ROUNDUP® ORIGINAL .....	13
1.7 FOLICUR 200 EC® .....	18
1.8 TESTE DO MICRONÚCLEO .....	21
1.9 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO.....	25
1.10 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO COM LARANJA DE ACRIDINA (LA) .....	33
1.11 O ENSAIO COMETA .....	35
1.12 BIOINDICADORES.....	47
1.13 ANESTESIA DOS PEIXES .....	50
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 BIOINDICADORES UTILIZADOS.....	53
3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS .....	55
3.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	56
3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DE MATERIAL PARA CADA BIOENSAIO.....	58
3.5 TESTE DOS MICRONÚCLEOS .....	60
3.6 ENSAIO COMETA .....	61
3.7 ANÁLISES DE DANO AO DNA PELO ENSAIO COMETA.....	63
3.8 ANÁLISES DE ERITRÓCITOS COM LARANJA DE ACRIDINA (LA).....	64
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
4.1 RESULTADOS DA RELAÇÃO ENTRE ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS E POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES ....	66
4.1.1 Resultados da exposição ao Roundup® Original (1,58 e 3,16 mg/litro). .....	68
4.1.2 Resultados da exposição ao FOLICUR® (0,4 e 0,8 mg/litro).....	70

4.1.3 Resultados da exposição ao FOLICUR® (0,8 mg/litro) e ao Roundup® (3,16 mg/l). .....	72
4.2 RESULTADOS REFERENTES AOS MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) .....	74
4.2.1 Resultados da exposição ao Roundup® Original (1,58 e 3,16 mg/litro).78	
4.2.2 Resultados da exposição ao Folicur® (0,4 e 0,8 mg/litro).....	81
4.2.3 Resultados da exposição ao Folicur® (0,8 mg/litro) e Roundup® (3,16 mg/l). .....	83
4.3 RESULTADOS REFERENTES AO ENSAIO COMETA.....	85
4.3.1 Resultados da exposição ao Roundup® (1,58 e 3,16 mg/l).....	85
4.3.2 Resultados da exposição ao Folicur® (0,4 e 0,8 mg/l) .....	89
4.3.3 Resultados da exposição ao Folicur® (0,8 mg/l) e ao Roundup® (3,16mg/l) .....	91
4.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	93
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES NOS DIFERENTES BIOENSAIOS	101
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>108</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>120</b>
7.1 TABELAS DE RESULTADOS .....	121
7.2 PROTOCOLO DO ENSAIO COMETA – MÉTODO ALCALINO .....	169
7.2.1 Solução de Lise - Estoque .....	169
7.2.2 Solução de Lise - Uso.....	170
7.2.3 Tampão de Eletroforese .....	171
7.2.4 Tampão de Neutralização.....	172
7.2.5 PBS.....	173
7.2.6 Agarose normal 1,5 % .....	174
7.2.7 Agarose de Baixo Ponto de Fusão (LMP) - 0,5% .....	175
7.2.8 Metodologia .....	176

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O PROBLEMA AMBIENTAL

Os seres humanos estão em constante exposição a substâncias químicas presentes em medicamentos, alimentos, produtos de higiene pessoal, de limpeza, cosméticos, poluição, assim como também a diversas fontes de radiação natural e artificial. Destes agentes físico-químicos, apenas uma pequena parcela possui estudos que avaliam seus efeitos sobre os seres humanos e outros organismos.

O Chemical Abstract Service (CAS) uma divisão da American Chemical Society possuía em novembro de 2008 em seus registros mais 40 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas e mais de 60 milhões de seqüências químicas catalogadas (<http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regreport.pl>).

Muitos dos recursos vivos da terra se encontram em pontos geográficos específicos como, por exemplo, ao longo de grandes rios, manguezais e outras regiões litorâneas. Ocorre que, justamente nestas regiões, vivem mais de três bilhões dos habitantes da terra e estas populações acabam mantendo com seu habitat estreita dependência de recursos alimentares, habitacionais e até mesmo industriais. Como resultado desta íntima proximidade, muitos dos resíduos domésticos e industriais gerados acabam alcançando e comprometendo a qualidade de vida dos ecossistemas e evidentemente do próprio homem (MOORE *et al.*, 2004).

Desta forma com uma freqüência cada vez maior, compostos químicos estranhos ao ambiente, chamados genericamente de *xenobióticos*, têm chegado e influenciado a dinâmica dos ecossistemas (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Existe ainda, uma grande demanda por fontes de água pura e segura para fins de consumo humano, agricultura e mesmo diversão. As águas utilizadas para este consumo, normalmente provêm de grandes reservatórios naturais como lagos ou rios que freqüentemente recebem resíduos das indústrias e da agricultura.

Por este motivo, as buscas por fontes limpas e seguras para a captação de água, são realizadas em locais cada vez mais distantes dos grandes centros de consumo (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2008).

Dentre os ecossistemas, os aquáticos, são aqueles que por lançamento direto ou indireto (carreamento) acabam sendo o depósito final da maioria dos xenobióticos despejados nos ecossistemas. No entanto, a simples presença de um xenobiótico em um ecossistema aquático, não pode por si só indicar um efeito deletério a este ecossistema. Conexões devem ser estabelecidas entre os níveis externos da exposição dos organismos com seus possíveis efeitos internos (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; HORI *et al.* 2008).

Outros fatores como a radiação ultravioleta (UV), aumento ou diminuição de nutrientes e diminuição do oxigênio disponível, entre outros, contribuem para aumentar o estresse ambiental. Deve-se enfatizar que, normalmente, muitos destes fatores acabam ocorrendo em conjunto.

Alguns dos xenobióticos que com maior frequência alcançam os ecossistemas são os bifenis policlorados (PCBs), os pesticidas organoclorados e organofosforados (OCPs), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e as dioxinas entre outros (MARONI, 2000 e OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Um complicador adicional na análise de risco ambiental, baseado apenas nas concentrações ambientais de um poluente, é colocado quando se sabe que muitos poluentes e seus derivados são capazes de interagirem entre si. Os efeitos deletérios sobre as populações são freqüentemente difíceis de serem percebidos uma vez que estes efeitos tendem a se manifestar após longos períodos de tempo (JHA, 2008).

## 1.2 BIOMARCADORES, BIOINDICADORES, BIOTRANSFORMAÇÃO E BIOMONITORAMENTO.

Com o propósito de estudar a ação dos xenobióticos nos seres vivos, os pesquisadores utilizam-se dos *biomarcadores*. Entendendo-se como *biomarcador*, qualquer mudança de uma resposta biológica a um elemento ou substância química presente no ambiente que seja passível de ser detectada por alterações moleculares na célula, por alterações fisiológicas ou ainda por mudanças comportamentais nos organismos em estudo (PEAKALL, 1994).

Para Van Gastel e Van Brummellen (1996), o termo *biomarcador* não deve ser confundido com *bioindicador* e com *indicador ecológico*. O primeiro seria qualquer resposta biológica para uma substância química presente no ambiente, possível de ser medida dentro do organismo ou em seus produtos (pêlos, urina, fezes etc.), indicando um desvio da normalidade encontrada naqueles organismos não expostos ao elemento/substância. O segundo seria o organismo do qual se esta obtendo as informações das condições ambientais do seu habitat. O terceiro seria um parâmetro ecológico que descreve a estrutura e o funcionamento do ecossistema.

Esta conceituação é freqüentemente ignorada em publicações onde seus autores utilizam-se do termo *biomarcador* de forma genérica, servindo tanto para o parâmetro biológico como para a espécie que serve como modelo do ensaio, e.g. Gustavino *et al.* (2001); Rodriguez-Cea, Ayllon e Garcia-Vazquez (2003).

É praticamente impossível o monitoramento de todos os contaminantes aquáticos sejam eles de origem humana ou natural. No entanto, é possível submeter de diferentes formas plantas, animais e outros seres vivos a xenobióticos tóxicos e analisar suas respostas metabólicas com o uso de diferentes tipos de *biomarcadores*. Entre os diferentes tipos de *biomarcadores* destacam-se os parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos, enzimáticos e genotóxicos entre outros (PEAKALL, 1994).



*Biomarcadores* também podem ser usados para verificar o estado de saúde dos organismos ou servirem como sinais de alertas de risco ambiental (PAYNE *et al.* 1987).

*Biotransformação* ou *metabolismo* pode ser definido como a conversão de um composto xenobiótico (substância estranha ao ambiente) catalisada por enzimas que o tornam mais solúvel em água, podendo desta forma ser excretado pela célula ou organismo mais facilmente que o composto original. Esta *biotransformação*, freqüentemente envolve enzimas que possuem um grau relativamente baixo de especificidade pelo substrato, quando comparadas com as enzimas envolvidas no metabolismo de compostos constitutivos normais das células (VERMEULEN, 1996).

*Biomonitoramento* consiste no uso regular e sistemático de organismos vivos (*bioindicadores*) para avaliar mudanças no ambiente ou na qualidade da água (DE ZWART, 1995).

### 1.3 GENÉTICA TOXICOLÓGICA – GENOTOXICIDADE E MUTAÇÕES

A Genética Toxicológica estuda as mudanças induzidas por agentes xenobióticos no material genético dos seres vivos. Os estudos de genotoxicidade podem abranger dois aspectos:

O primeiro analisa os efeitos do produto sobre o material genético, que podem resultar em alterações na estrutura do DNA como as quebras em fita simples ou dupla e a formação de adutos (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas do DNA) entre outros. Estas alterações ocorridas na molécula de DNA, quando não reparadas podem levar as mutações. Sabe-se que a capacidade de reparo do DNA diminui com o passar do tempo e que a taxa de mutação de cada divisão celular aumenta com a idade do indivíduo. Foi constatado que os sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki tiveram um aumento anual nas mutações no gene da Gliforina A (Grupo MN) (GRISOLIA, 2005).

O segundo analisa os efeitos destas alterações nos produtos gênicos (RNAs, polipeptídeos e proteínas) os quais podem se refletir nas populações alterando sua fertilidade e sua capacidade de responder as mudanças ambientais entre outras (GRISOLIA, 2005).

A partir destes aspectos se destacam três linhas de estudos: a identificação da frequência e modo como uma alteração genética se desenvolve em face da exposição de um agente xenobiótico; o estudo dos mecanismos físicos e químicos que causam estas desordens e a avaliação de agentes com potencial para ocasioná-las.

A exposição de um organismo a compostos xenobióticos pode ser o fator indutor de uma cascata de eventos sobre o DNA que pode levar a formação de alterações nesta macromolécula. Como resultado desta mudança, podem ocorrer diversas disfunções metabólicas que podem levar a vários tipos de doenças, inclusive ao câncer. A detecção e quantificação destes eventos podem ser

empregadas com a utilização de um biomarcador de exposição e de efeitos em organismos expostos a xenobióticos no ambiente (MARONI, 2000).

Uma provável causa da iniciação do câncer pode ser a formação de adutos, como resultado da interação de compostos genotóxicos com o DNA, caso não ocorra o reparo desta lesão, esta pode ser propagada para as células filhas. Estas células podem permanecer latentes por muitos anos acumulando novos danos ou ainda sofrerem uma exposição posterior a um agente promotor, em ambos os casos poderiam se desencadear um processo de malignização. Os agentes iniciadores do processo geralmente estabelecem ligações diretas ao DNA, enquanto que os promotores podem agir mimetizando hormônios, alterando a expressão gênica ou as vias metabólicas das células (GRISOLIA, 2005).

Muitos dos xenobióticos lançados ao ambiente constituem-se de agentes causadores de mutações gênicas e de alterações cromossômicas. Alguns destes são chamados de aneugênicos, pois atuam provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular, dando origem a aneuploidias. Outros, chamados de clastogênicos, induzem quebras e produzem alterações na estrutura do cromossomo. Estas quebras e alterações podem ser detectadas através de estudos citogenéticos. Portanto, tendo um efeito clastogênico ou não, através de ensaios de genotoxicidade e citogenéticos, é possível proceder-se à avaliação dos efeitos mutagênicos de um determinado composto, o que torna estes tipos de teste imprescindíveis nas avaliações de risco aos seres humanos e ao ambiente (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

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. No entanto sob o ponto de vista genético os efeitos mutagênicos destas substâncias podem não se manifestar por várias gerações, mas em um dado momento de sua história, passar a ter um efeito importante (PADRANGI *et al.*, 1995).

#### 1.4 ESCOLHA DOS BIOINDICADORES

Dentre as plantas ou vertebrados escolhidos, para os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade, *o uso de organismos endêmicos como sentinelas ambientais será sempre preferível ao uso de espécies exóticas*. No entanto para que este objetivo possa ser alcançado de maneira eficiente, *o organismo endêmico eleito para este fim deve ser submetido a ensaios suficientemente sensíveis com a finalidade de ser estabelecido um padrão de resposta aos agentes genotóxicos* (PADRANGI *et al.*, 1995).

No caso de ensaios com substâncias mutagênicas presentes na água ou em sedimentos, estes podem ser realizados em condições laboratoriais com o uso de vários tipos de animais como, por exemplo, anfíbios, moluscos e peixes, os quais servirão como bioindicadores da poluição do meio aquático (MINISSI; CICCOTTI; RIZZONI, 1996).

Para este propósito, *os mais adequados são os peixes*, assim como os mamíferos, pois sofrem bioacumulação, respondem a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o citocromo P450 (enzima responsável pelo metabolismo oxidativo de compostos lipofílicos de origem endógena ou exógena como hormônios esteróides ou poluentes ambientais), em resposta a poluentes (GOKSOYR *et al.*, 1991).

Ensaio com animais vivos possibilitam várias vias de administração da substância em estudo, quer seja através dos alimentos, da água ou mesmo injetando-se diretamente no animal. Pode-se ainda avaliar seus efeitos em órgãos ou tecidos específicos, em células germinativas ou somáticas assim como diferenças entre contaminações crônicas e agudas. Estas possibilidades de comparações podem nos fornecer uma gama de resultados que reproduzem, no melhor possível, as condições de uma exposição dos seres humanos a estas substâncias (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

Desta forma, estudos sobre a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de substâncias e elementos químicos, se revestem de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por estes. Permitindo ainda avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas. *Além do que as análises de seus efeitos sobre o material genético são importantes na avaliação de seu papel mutagênico e/ou carcinogênico e ainda seus possíveis efeitos sobre as populações, uma vez que estas substâncias podem atuar de maneira a diminuir a variabilidade genética da população* (PADRANGI *et al.*, 1995).

Deve-se ressaltar que devido à variedade de possíveis efeitos de um xenobiótico, um teste isolado não é suficiente para avaliar a atuação deste sobre um ser vivo. Também se deve considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos a espécie estudada bem como a efeitos sinérgicos ou antagônicos com outras substâncias disponíveis no meio (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991 e FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2008).

## 1.5 AGROTÓXICOS OU DEFENSIVOS AGRÍCOLAS?

O questionamento proposto no título não é provocativo, mas sim um dilema. Dependendo sob qual ângulo seja analisado, qualquer um dos termos é válido. É verdade de que sem estas substâncias, a produção mundial de alimentos seria muito inferior à produção atual. Mas também é verdade que a presença destas substâncias tem causado grandes problemas ambientais.

Em face da grande demanda por alimentos a humanidade encontra-se frente a um grande dilema: ou aumenta a sua fronteira agrícola, o que efetivamente está ocorrendo com visíveis prejuízos ambientais, ou aumenta sua produtividade, o que também está ocorrendo com a utilização de diferentes tipos de agrotóxicos que garantem esta produtividade. É fato, que qualquer tipo de cultura agrícola usa algum tipo de agrotóxico em alguma fase do seu desenvolvimento, com exceção talvez da chamada “agricultura orgânica”, a qual, também não está imune a aplicação de produtos químicos na sua prática, embora estes produtos sejam considerados naturais, estas misturas podem ser tóxicas.

Os agrotóxicos (herbicidas, fungicidas, inseticidas) são misturas químicas muito complexas e heterogêneas. Vários dados experimentais revelam que muitas destas substâncias podem induzir alterações cromossômicas, mutações e danos ao DNA ou às proteínas de sua estrutura (D'ARCE; COLUS, 2000; GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001 e 2002; JABLONIKA *et al.*, 2001).

Na formulação dos agrotóxicos entram além do princípio ativo propriamente dito, os agentes de dispersão e os solubilizantes (também chamados de surfactantes) dentre outros. De uma maneira geral estes dois últimos componentes são chamados de “substâncias inertes” (BOLOGNESI, 2003).

Um total de mais de 900 ingredientes ativos estão registrados como pesticidas no EUA e entram na composição de mais de 20.000 agrotóxicos. Os ingredientes ativos dos agrotóxicos são muito bem conhecidos do ponto de vista de

atuação agrônomo, bem como de seus efeitos tóxicos. No entanto, via de regra, o que chega a ser vendido comercialmente são formulações que contêm o princípio ativo acrescidas dos “inertes”, sendo consideradas como segredo industrial. Muitas destas substâncias podem permanecer ativas no ambiente por muitos anos ou ainda gerarem subprodutos tóxicos como consequência de sua degradação (BOLOGNESI, 2003).

Existem casos em que o princípio ativo do agrotóxico é fracamente mutagênico, no entanto o produto comercial é capaz de induzir aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, micronúcleos e mutações, como é o caso do Malathion (TITENKO-HOLLAND *et al.*, 1997).

Um dos compostos “inertes” do agrotóxico Bimeton (herbicida usado no controle das folhas largas em plantações de cana-de-açúcar) é o composto nonilfenol etoxilado que, em ensaios realizados pelo Departamento de Genética da UNB utilizando-se de células meristemáticas de cebola como bioindicadores, mostrou-se aneugênico (GRISOLIA, 2005).

Os agrotóxicos são a mais freqüente forma de auto-envenenamento (voluntário ou involuntário) no mundo desenvolvido, estima-se em torno de 3 milhões o número de vítimas de envenenamento, sendo que destes, 220 mil casos fatais (EDDLESTON *et al.*, 2002).

Ensaio realizado com dois grupos de trabalhadores expostos a agrotóxicos, um deles usando equipamento de proteção e outro não, demonstraram através do Teste do Micronúcleo em linfócitos, um acréscimo significativo do número de células com estas estruturas nos trabalhadores do segundo grupo notadamente naqueles do sexo feminino (MARONI, 2000; COSTA, *et al.* 2007).

Em outro ensaio também realizado com trabalhadores expostos a agrotóxicos, porém utilizando-se além do Teste do Micronúcleo em linfócitos o Ensaio Cometa, só foi observada diferença significativa no último ensaio (REMOR, *et al.* 2008).

Quando se fala dos agrotóxicos, é importante considerar a sua chamada *meia vida*. Ela é definida como sendo o tempo requerido para que a metade do agrotóxico presente após uma aplicação seja transformado em produtos de degradação. Este período de tempo depende de uma grande variedade de fatores como temperatura, pH, microorganismos presentes no solo e exposição à luz entre outros. É importante ressaltar que os produtos originados pela degradação são eles mesmos muitas vezes tóxicos e também tem sua meia vida no ambiente. Pode-se determinar diferentes tipos de meia vida: no solo (anaeróbico ou aeróbico), na presença de água e na de luz (PAN. <http://www.pesticideinfo.org/Index.html>).

Deve-se ainda salientar que no meio rural, com a intenção de economizarem nos custos de aplicação, é pratica comum dos agricultores realizarem a mistura de vários agrotóxicos, as chamadas “misturas de tanques”. Do ponto de vista de toxicidade estas misturas são altamente imprevisíveis, pois as substâncias podem interagir potencializando seus efeitos mutagênicos, carcinogênicos e danosos aos ecossistemas.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) disponibiliza um serviço ([http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)), denominado de Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), onde é possível consultar dados técnicos de todos os agrotóxicos vendidos legalmente no Brasil. Neste sistema os produtos recebem uma Classificação Ambiental (Classe I – Altamente Perigoso; Classe II – Muito Perigoso; Classe III – Perigoso; Classe IV – Pouco Perigoso e uma última que é a de Baixo Risco ao Ambiente). Recebem também uma Classificação Toxicológica (Classe I – Extremamente Tóxico; Classe II – Altamente Tóxico; Classe III – Medianamente Tóxico e Classe IV – Pouco Tóxico).

No Brasil a Lei 7.802/89 regulamentada pelo Decreto 4.074/02 estabelece os parâmetros de avaliação dos efeitos nocivos dos agrotóxicos no país.



No entanto, as metodologias de avaliação das empresas produtoras dos agrotóxicos possuem artifícios para produzirem testes negativos, tais como a substituição das formas ácidas por sais e o uso de diferentes formas isoméricas do produto. Nenhum agrotóxico foi classificado como mutagênico pelo seu fabricante. Segundo Grisolia (2005) o herbicida alaclor fabricado nos USA, mas com venda proibida naquele país, aumentou 6 vezes suas exportações para a Índia, Tailândia, Brasil, Cingapura Filipinas e Bélgica.

O Brasil responde por 55% do mercado latino-americano de agrotóxicos e desde 1994 os herbicidas vendidos no país, representam mais de 50% das vendas destes produtos realizadas na América do Sul.

As contaminações do meio aquático por estes produtos ocorrem com freqüência através do processo de carreamento do solo, pela lavagem dos equipamentos de pulverização ou ainda por derivação quando da aplicação por via aérea.

Do ponto de vista ecológico, estes produtos podem ocasionar interferências nas comunidades de um ecossistema. O agrotóxico pode causar um aumento no risco de predação das espécies afetadas pelo produto em função de distúrbios metabólicos. Sabe-se ainda que repetidas doses subtóxicas podem eliminar espécies mais sensíveis deixando aquelas mais tolerantes (PELLACANI, *et al.* 2006 e OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

## 1.6 ROUNDUP® ORIGINAL

O Roundup Original® fabricado pela Monsanto tem como princípio ativo a substância denominada genericamente de *glifosato* ( $C_3H_8NO_5P$ ). Com nome técnico de *N*-(phosphonomethyl)glycine. Esta denominação é usada tanto pela International Union of Pure and Applied Chemestri (IUPAC) quanto pela Chemical Abstract Service (CAS), (Número CAS – 38641-94-0) ([www.pesticideinfo.org/Index.html](http://www.pesticideinfo.org/Index.html)).

Seu peso molecular é de 169,07 na forma ácida e de 228,20 na forma de sal de isopropilamina (o ingrediente ativo do glifosato). É um sólido branco, sem odor, de densidade  $0,5 \text{ g/cm}^3$  com ponto de fusão a  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  e solubilidade de  $10,5 \text{ g/l}$  em  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (IUPAC - <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/373.htm>).

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) este produto tem o número de registro 0898793 recebendo Classificação Ambiental III (Perigoso) e Classificação Toxicológica III (Medianamente Tóxico) e segundo a Organização Mundial de Saúde ele é considerado de baixa toxicidade (LANGIANO; MARTINEZ, 2008).

O glifosato foi criado em 1950 pelo Dr. Henri Marin, um químico suíço da industria química Cilag, posteriormente esta substância foi vendida para a Aldrich Chemical, já 1970, Dr. J. E. Franz da Monsanto Company descobriu a capacidade herbicida do produto (SMITH; OEHME, 1992).

O glifosato é o princípio ativo de vários herbicidas de amplo espectro, isto significando que atingem uma grande variedade de plantas. Este herbicida vem sendo largamente utilizado desde a década de 70 no controle pós-emergente em vários tipos de culturas em praticamente todas as partes do mundo (GALLI; MONTEZUMA, 2005 e LANGIANO; MARTINEZ, 2008).

Considerando-se todos os produtos usados como agrotóxicos (ou defensivos agrícolas) o glifosato puro e suas formulações é o produto mais vendido para a agricultura moderna (PEIXOTO, 2005).

Vendido sob diversos nomes comerciais: MON 8709; Rodeo; Roundup; Vision; Ron-do; Roundup custom; Roundup ultra; Glyfos BIO; Glyfos AU; Roundup Biactive; Roundup Transorb; Roundup Ultramax; Roundup Original; Glyphosate 360; Glyfos; Accord; Roundup 360; Glypro; Glycel; Aqua Star; Roundup Pro; Fakel. Diferem entre si pela formulação e concentrações do princípio ativo, além de outras substâncias presentes na formulação (GALLI e MONTEZUMA, 2005; [www.pesticideinfo.org/Index.html](http://www.pesticideinfo.org/Index.html)).

Para os bioensaios do presente trabalho foi utilizado o Roundup® Original, comprado diretamente de uma loja de produtos agropecuários em Florianópolis – SC e como peculiaridade sem a necessidade de apresentação de receituário agrônomo, embora a legislação o exija.

O glifosato tem ação sistêmica, sendo absorvido basicamente pelas regiões clorofiladas das plantas (folhas e caules verdes) e translocado através do floema para os tecidos meristemáticos. Sua atuação se dá pela inibição da atividade da 5 – enolpiruvilshiquimato – 3 fosfato sintase (EPSPS), a qual é uma enzima catalizadora de reações de síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, inibindo também a síntese de clorofila e estimulando a produção de etileno (COLE, 1985; SOUZA, 1998).

No Roundup® Original para melhorar a eficácia do produto é adicionado o surfactante polietoxileno amina (POEA). Sabe-se que os efeitos toxicológicos do POEA são mais graves do que o glifosato em si (LANGIANO; MARTINEZ, 2008).

Estudos em peixes visando determinar a concentração de letalidade no prazo de 96 horas (96h-LC<sub>50</sub>) mostraram grande variação nestas concentrações para diferentes espécies. Em carpas (*Cyprinus carpio*) foram determinadas concentrações de 620 mg/litro do glifosato. No entanto ao ser utilizado o produto comercial (Roundup® Original), as concentrações para 96h-LC<sub>50</sub> variaram de 2 a 55 mg/litro. Estas variações são dependentes da espécie de peixe, estágio de vida e das condições do teste (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002).

Outras variações também são encontradas nas respostas de biomarcadores ao serem utilizadas espécies diferentes de peixes, como por exemplo, respostas hormonais ao estresse. Os chamados “nativos” mostraram-se mais sensíveis do que espécies introduzidas no nosso ambiente (LANGIANO; MARTINEZ, 2008).

O glifosato é fortemente adsorvido pelos colóides presentes no solo e suspenso na forma de partículas na água. Estudos nos quais foi coletada a água que passou (*runoff*) por plantas tratadas com o glifosato, demonstraram que após um dia da aplicação do produto foi detectada a concentração de 5 mg/l e quatro meses após ainda era possível encontrar a concentração de 2 µg/l (SMITH; OEHME, 1992).

O principal produto de degradação do glifosato é o ácido aminometil fosfórico (AMPA). Embora muitas agências reguladoras nos Estados Unidos e na Comunidade Européia indiquem o glifosato e o AMPA como de baixo risco a saúde humana, pesquisas recentes demonstraram que ambos os produtos apresentam grande mobilidade e persistência no ambiente aquático em comparação com o produto formulado (KOLPIN *et al.*, 2006).

Segundo a Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde em seu Artº 14, o valor máximo permissível (VMP) desta substância na água potável é de 500 µg/l. No entanto, no GUIDELINES FOR DRINKING WATER QUALITY STANDARDS IN DEVELOPING COUNTRIES publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na sua secção Panamericana em 2002, esta quantidade é de 1 mg/l. No estado do Paraná mais de 4 mil toneladas de glifosato foram usadas nas culturas de milho e soja entre os anos de 2000 e 2001 (INOUE *et al.*, 2003)

A variação da meia vida do glifosato não parece ter relação com o pH ou a quantidade de matéria orgânica, mas freqüentemente esta relacionada com a atividade microbiana no solo (SMITH; OEHME, 1992).

O AMPA é mais persistente no solo (76 a 240 dias) do que o glifosato (2 a 197 dias) e existem evidências que o AMPA pode alcançar lençóis freáticos profundos (LANDRY *et al.*, 2005).

O AMPA mostrou-se genotóxico (Ensaio do Cometa e Teste do Micronúcleo) em culturas de linfócitos expostos por 4 horas ao produto (MAÑAS *et al.* 2008).

Estudos têm reportado diversos problemas em organismos aquáticos e terrestres quando expostos ao princípio ativo ou ao produto formulado.

MARC; MULNER-LORILLON e BELLÉ (2004), constataram que diversos pesticidas baseados no glifosato, inclusive o Roundup 3plus®, foram capazes de interferir de maneira acentuada no ciclo celular de células embrionárias de ouriço-do-mar.

Sabe-se que falhas nos *checkpoints* do ciclo celular podem levar a uma instabilidade genômica e subsequente desenvolvimento de câncer (MOLINARI, 2000; STEWART; WESTFALL; PIENTENPOL, 2003)

DALLEGRAVE *et al.* (2003) observaram que ratos Wistar tratados com diferentes dosagens de ROUNDUP® apresentaram problemas de malformação esquelética e de outras estruturas e também um alto índice de abortos. Concluem que o produto teve tanto uma ação tóxica como a de retardar o desenvolvimento esquelético dos fetos.

SZAREK *et al.* (2000) expuseram carpas (*Cyprinus carpio*) ao Roundup® em dosagens de 205 mg/l e 410 mg/l e analisaram seus hepatócitos por microscopia eletrônica. Concluem que o produto ocasionou o desaparecimento das membranas internas das mitocôndrias, o aparecimento de estruturas parecidas com mielina nas células estudadas e ainda o aumento do tamanho de algumas mitocôndrias.

GRISOLIA (2002) expôs através de injeção intraperitoneal com diferentes concentrações, camundongos (50, 100 e 200 mg/kg) e peixes da espécie *Tilapia rendalli* (42, 85 e 170 mg/kg) constatando que em todas as dosagens utilizadas ocorreu a formação de micronúcleos de maneira estatisticamente significativa nos eritrócitos circulantes dos peixes, embora nos camundongos isto não tenha ocorrido.

Embora o Roundup seja muito utilizado no mundo, apenas um limitado número de trabalhos e informações estão disponíveis sobre seus efeitos tóxicos em peixes nativos, Gluszczak *et al.* (2006, 2007), relataram alterações em atividades

metabólicas e parâmetros enzimáticos nas espécies neotropicais piava (*Leporinus obtusidens*) e bagre (*Rhamdia quelen*).

### 1.7 FOLICUR 200 EC®

O Folicur®, fabricado pela Bayer®, tem como princípio ativo a substância denominada genericamente de **tebuconazole** (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O). Tecnicamente chamado de (RS)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol pela IUPAC e de alpha-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-alpha-(1,1-dimethylethyl)-1*H*-1,2,4-triazole-1-ethanol pela CAS (Número CAS – 107534-96-3). O produto é comumente utilizado na agricultura no controle de fungos em vários tipos de cultura, como de arroz, café e soja.

Esta substância possui solubilidade de 36 mg/l, densidade de 1,25 g/cm<sup>3</sup>, ponto de fusão de 105 °C. Tem sua meia vida no solo estimada em mais de 365 dias e em ambiente aquoso este período foi estimado em 28 dias com pH 5 a 9 e 25 °C. Em pH 7 e a 20 °C é estável (IUPAC-<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/610.htm>; PAN- [www.pesticideinfo.org/Index.html](http://www.pesticideinfo.org/Index.html)).

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) este produto tem o número de registro 02895 recebendo Classificação Ambiental II (Muito Perigoso) e Classificação Toxicológica III (Medianamente Tóxico).

Ao contrário do glifosato, o tebuconazole não tem citação na Portaria 518 do Ministério de Saúde de valor máximo permitido (VMP) na água potável.

Para a Environmental Protection Agency (EPA) a concentração de tebuconazole na água não foi determinada, sendo indicada a concentração máxima de sub-produtos originados de sua degradação. Estes produtos são o 1,2,4 - triazol, triazol alanina e o ácido acético triazólico os quais, em conjunto não podem ultrapassar em exposição aguda a concentração de 0,041 ppm e de 0,0011 em exposição crônica (<http://www.regulations.gov>).

No plantio da soja, existe uma grande preocupação com o controle de uma doença chamada de *ferrugem asiática* ocasionada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. Esta doença merece tanta atenção da EMBRAPA que foi criada uma

parceria público-privada (<http://www.consortioantiferrugem.net/>) para o monitoramento da doença em todas as regiões onde existe o cultivo da soja.

O Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT, possui em sua base de dados para a safra de 2008/2009 cerca de 40 produtos registrados para o combate a ferrugem. Na Circular Técnica nº 42 de 2007 da EMBRAPA, são listados os vários fungicidas e suas concentrações no combate a doença. No caso específico do Folicur, ½ litro do produto comercial por hectare.

Para a Environmental Protection Agency (EPA) o tebuconazole é classificado como sendo um carcinogênico do Grupo C (possível carcinogênico para humanos), baseados no aumento de adenomas e carcinomas em camundongos de ambos os sexos expostos a altas doses do produto. No entanto, não encontraram evidências carcinogênicas em ratos e consideram então que não existem evidências de genotoxicidade para o tebuconazole. Concluem que uma dose de 0,029 mg/kg/dia não seria perigosa, visto que, esta seria 9600 x menor daquela que teve efeito carcinogênico em camundongos (279 mg/kg/dia) (<http://www.epa.gov/EPA-PEST/2008/May/Day-14/p10506.htm>).

Nos peixes teleósteos o hormônio cortisol é o principal glucocorticoesteróide produzido pelo tecido renal em resposta a estimulação pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Em experimentos conduzidos com jundiás (*Rhamdia quelen*), expostos por via hídrica ao tebuconazole (Folicur 200) pelo período de 96 h foi observada uma diminuição significativa na dosagem do cortisol plasmático em resposta a exposição intraperitoneal do ACTH. O mesmo não ocorrendo com outro grupo expostos ao glifosato (Roundup) (CERICATO *et al.* 2008).

São relatados também em ratos problemas no desenvolvimento neurológico e comprometimento do sistema imunológico devido a exposição ao tebuconazole (MOSER, *et al.* 2001).

A Bayer®, em informações técnicas sobre o produto indica que o mesmo apresenta toxicidade em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) na magnitude de 9,20



mg/l para uma CL 50 com exposição de 96 horas e de 45 mg/l para peixes do gênero *Lebistes* nas mesmas condições.

Uma preocupação que se faz presente diz respeito a larga utilização tanto do glifosato (Roundup) quanto do tebuconazole (Folicur) concomitantemente. Como existem grandes áreas plantadas com soja transgênica, e esta não é afetada pelo glifosato, este se torna o produto indicado no controle de plantas invasoras. E como também na cultura da soja existe o problema da ferrugem cujo controle pode ser feito com o tebuconazole, estas duas substâncias que oferecem risco potencial à saúde dos animais permanecem juntas por um período de tempo relativamente longo no solo e na água.

## 1.8 TESTE DO MICRONÚCLEO

Ainda que a nossa compreensão a respeito da estrutura cromossômica seja incompleta, vários trabalhos têm apontado para a direção de que as anormalidades cromossômicas sejam uma consequência direta de danos causados na sua estrutura. Também é reconhecido que as perdas de cromossomos, ou parte deles; ou ainda as aneuploidias decorrentes de problemas de não disjunção, são fatores importantes em muitos tipos de câncer e no processo de envelhecimento. Estes problemas são ocasionados por defeitos no fuso, no centrômero ou ainda em função do grau de condensação dos cromossomos (FENECH, 2000).

Na citogenética clássica, a avaliação das alterações cromossômicas é realizada diretamente pela análise dos cromossomos, no entanto, a obtenção de metáfases é um processo trabalhoso e complexo. Com o intuito de verificar danos ao material genético foi estimulado o desenvolvimento de técnicas que permitissem esta avaliação de uma maneira mais rápida e eficiente (FENECH, 2000).

SCHMID (1975) e HEDDLE (1973), independentemente, propuseram um tipo de ensaio que permitia a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação de umas estruturas citoplasmáticas conhecidas pelos hematologistas como corpúsculos de Howell-Jolly, os quais são encontrados em populações celulares em divisão. Estas estruturas receberam o nome de micronúcleos.

Originalmente, o teste do micronúcleo foi desenvolvido para estudos *in vivo* dos efeitos de produtos químicos. Para este fim eram utilizadas células eritrocitárias policromáticas obtidas da medula óssea do fêmur de camundongos. Mais tarde passou-se a utilizar eritrócitos circulantes. Em qualquer caso os testes são realizados normalmente com animais criados em laboratório e sob condições bem controladas (SCHMID, 1975).

O princípio do teste está baseado no fato de que, durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas

fibras do fuso para pólos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero sim. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. Elementos que não foram transportados pelo fuso também podem ser englobados pelos núcleos recém formados. No entanto, alguns destes elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos novos núcleos e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (SCHMID, 1975).

Pode-se conceituar os micronúcleos como sendo corpúsculos extranucleares formados durante o processo da mitose, os quais são o resultado de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não ficaram incluídos em nenhum dos núcleos filhos, originados no processo de divisão celular (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Segundo Ferrari (1991), “os micronúcleos se originam a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo de célula-filha durante a divisão celular. Assim, o ensaio detecta tanto os eventos clastogênicos como defeitos no fuso da célula”.

Desta maneira, os efeitos de substâncias que provoquem quebras cromossômicas ou ainda afetem os componentes do fuso ou da região centromérica podem ser detectados a partir da presença de micronúcleos. Deve-se ressaltar que nem todos os produtos genotóxicos são clastogênicos, muitos induzem a formação dos micronúcleos por sua capacidade de afetarem o fuso (HEDDLE *et al.*, 1991).

Desta forma, eventos clastogênicos ou aneugênicos dariam origem aos micronúcleos. Os primeiros referem-se aos eventos de dano diretamente no cromossomo e seus componentes, notadamente no DNA. O segundo refere-se aos eventos que causam danos no mecanismo do fuso e outros componentes envolvidos na separação dos cromossomos (ALBERTINI *et al.*, 2000).

Para Heddle *et al.* (1983), este teste é potencialmente sensível para quantificar a freqüência de anormalidades cromossômicas surgidas nos cromossomos humanos.

A obtenção de células que servirão para análise dos micronúcleos pode ser feita da medula óssea, neste caso normalmente utiliza-se a medula óssea do fêmur; a partir de células esfoliadas dos epitélios: bucal (através de uma simples raspagem), dos brônquios (através da coleta do escarro), da bexiga urinária (pela coleta da urina, mas neste caso só a proveniente de indivíduos do sexo masculino, pois a urina coletada de indivíduos do sexo feminino pode apresentar células da mucosa vaginal) e de sangue periférico (análise de linfócitos e eritrócitos nucleados ou reticulócitos) (FERRARI, 1991).

Comparações entre cultura de linfócitos humanos e de células do baço de camundongo expostas a compostos aneugênicos indicam uma alta sensibilidade de ambas as células para a formação de micronúcleos (STEIBLEN *et al.* 2005).

Evidencia-se que o teste só pode ser realizado com populações de células que tenham a capacidade de entrarem em divisão e preferencialmente que a análise seja feita após um único ciclo de divisão, pois existe a incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo de divisão (FENECH, 2000).

Uma vez que a formação dos micronúcleos, só pode ser observada após a ocorrência da divisão celular, as freqüências destes em um conjunto de células é dependente do tempo que a célula leva para entrar em divisão, do tipo de tecido, da espécie que está sendo usada para o teste e de condições ambientais. Portanto, são necessários um controle e conhecimento prévio da cinética de divisão da célula que será utilizada para o teste (AL-SABTI; METCALFE, 1995; FENECH, 2000).

Como a presença dos micronúcleos em uma célula fica condicionada a sua não inclusão no núcleo da célula filha, espera-se, que uma parte de “potenciais” micronúcleos não sejam visualizados. São considerados micronúcleos aqueles que são formados e estão visivelmente separados do núcleo principal da célula possuindo um tamanho que corresponde de 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo e ainda que não ultrapassem em 1/3 o tamanho do núcleo principal. Devem ainda, possuir bordas distinguíveis e com a mesma refringência do núcleo principal. No caso específico dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos

cromossomos, esta proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo (AL-SABTI; METCALFE, 1995; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; GUSTAVINO *et al.*, 2001).

Durante o processo de contagem dos micronúcleos, são analisadas entre 1 mil e 2 mil células, com membranas citoplasmáticas e nucleares intactas, não sendo analisadas aquelas que estejam sobrepostas ou danificadas (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Em todos os ensaios com micronúcleos deve-se levar em consideração a ocorrência espontânea destes, embora o número basal seja baixo, pode aparecer em maior frequência em roedores (cerca de 3‰) do que em peixes (WILLIAMS; METCALFE, 1992).

Como em qualquer técnica laboratorial, alguns fatores devem ser considerados na aplicação do ensaio com micronúcleos. Este ensaio não é capaz de detectar as não-disjunções mitóticas se estas não levarem à perda de cromossomos na anáfase, bem como não será possível detectar aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos. Desta forma o teste nestes casos apresenta uma subestimativa e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

Os ensaios feitos a partir da medula óssea de roedores são amplamente utilizados em estudos de genotoxicidade e fazem parte dos estudos sobre a avaliação de segurança de vários produtos (KRISHNA; URDA; PAULISSEN, 2000).

A sua utilização *in vivo* é indicada aos membros do Mercado Comum Europeu para a análise de substâncias químicas e controle de qualidade (DIRETIVA 92/69/CEE, MÉTODO B12).

## 1.9 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO

Hooftman e De Raat (1982), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como *Piscine Micronucleus Test*, e adotado neste trabalho como *Teste do Micronúcleo Písceo* (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Para Hose *et al.* (1987) este teste revelou grandes potencialidades por ser de rápida execução, *não dispendioso e um excelente indicador da contaminação química dos peixes.*

Desde o início de seus trabalhos, com o teste do micronúcleo com peixes Hooftman e De Raat (1982), fizeram observações sobre alterações morfológicas nos núcleos eritrocitários, os quais normalmente são elípticos, mas que em alguns casos perdiam esta forma usual.

Hose *et al.* (1987), ao analisarem as freqüências de micronúcleos em eritrócitos circulantes de duas espécies de peixes marinhos (*Genyonemus lineatus* e *Paralabrax clathratus*) coletados em regiões poluídas e não poluídas, da região sul da Califórnia, encontraram freqüências maiores de micronúcleos (na ordem de quatro vezes, na primeira espécie e na ordem de onze vezes na segunda espécie) entre os grupos. Neste trabalho, os autores descrevem várias alterações morfológicas nos núcleos dos eritrócitos circulantes. Como as freqüências das alterações morfológicas nucleares apresentavam diferenças significativas entre os grupos coletados nas regiões poluídas e os grupos coletados em regiões não poluídas, os autores sustentaram, em seu trabalho, que estas alterações morfológicas nucleares eram indicadores dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água. Consideraram ainda que estas alterações seriam possíveis de serem incluídas nas contagens dos micronúcleos realizadas em seu

trabalho. Estes autores concluem ainda que o teste dos micronúcleos seria aplicável a qualquer espécie de peixe, independente de suas características cariotípicas.

Carrasco, Tylbury e Myers (1990), fotografaram e quantificaram os micronúcleos encontrados em seu trabalho, assim como as alterações morfológicas nucleares encontradas. Estas alterações foram descritas e classificadas pelos autores em:

- a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). Os tamanhos destas evaginações situam-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbbed*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envoltório nuclear.

Em sua conclusão os autores põem em dúvida a aplicabilidade do teste dos micronúcleos píceos e a quantificação das alterações morfológicas nucleares, apontando-as como inconsistentes pelas seguintes razões: nos trabalhos publicados, são poucas as áreas geográficas comparadas nos estudos de campo; médias aritméticas são freqüentemente utilizadas para quantificar os micronúcleos; alguns resultados estão aparentemente relacionados a efeitos citotóxicos; e finalmente, as alterações morfológicas nucleares são atribuídas aos efeitos genotóxicos de substâncias, sem se considerar outros fatores etiológicos ou ambientais.

Estes autores ainda levantam a hipótese de que a Necrose Eritrocitária Viral poderia formar estruturas semelhantes aos micronúcleos ou as alterações morfológicas nucleares denominadas *blebbed*. Assim como as alterações denominadas *lobed*, lembram estruturas encontradas em eritrócitos de sangue periférico, oriundos de exemplares com anemia induzida pela ausência da vitamina B<sub>12</sub> ou por deficiência do ácido fólico.

No entanto esta opinião não é compartilhada por outros autores. Assim, para Al – Sabti e Metcalfe (1995), uma vez que os peixes teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos nestas células pode ser averiguada e usada como medida da atividade clastogênica ou aneugênica de substâncias no ambiente aquático.

Para Minissi, Ciccotti e Rizzoni (1996), o teste do micronúcleo mostrou resultados consistentes e sensíveis para a detecção dos efeitos mutagênicos de poluentes em ambientes aquáticos dulcícolas. Estas autoras realizaram estudos com a espécie *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) coletados em dois rios da região central da Itália. Um deles, o rio Mignone, não poluído e o outro, o rio Tibre, poluído. Como controles, utilizaram exemplares obtidos em estações de piscicultura e mantidos em condições laboratoriais. Várias amostras de sangue para a realização do teste foram coletadas em tempos diferentes, sendo a primeira no ato da captura. Como resultados obtiveram diferenças não significativas entre o grupo controle e os



exemplares coletados no rio Mignone e significativas em relação aos exemplares coletados no rio Tibre. Destacam ainda que não observaram efeitos sazonais nas freqüências dos micronúcleos e as freqüências destes diminuíram nos exemplares coletados no rio Tibre após 50 e 100 dias.

Gustavino *et al.* (2001), trabalhando com exemplares de carpa (*Cyprinus carpio*) submeteram um grupo à exposição de Raios – X e outro a colchicina por injeção intraperitoneal. Avaliaram posteriormente as freqüências de micronúcleos entre os tratados e os controles examinando células eritrocitárias circulantes coletadas por punção cardíaca. Variando as dosagens de radiação, as concentrações de colchicina e fazendo coletas de amostras de sangue em tempos diferentes (3, 7, 14, 21, 35, 50 dias após os tratamentos) obtiveram resultados interessantes, principalmente, no grupo tratado com colchicina.

Sabe-se que a colchicina é uma substância classicamente utilizada em estudos citogenéticos, pois impede a formação do fuso acromático durante o processo da divisão celular. Esta substância induz diferentes níveis de danos ao aparato mitótico desde c-mitose, mitose multipolar até a perda de cromossomos (GUSTAVINO *et al.*, 2001).

Em dois grupos tratados com concentrações diferentes de colchicina ( $1,6 \times 10^{-2}$  e  $8 \times 10^{-2}$  mg/kg) Gustavino *et al.* (2001), não observaram diferenças significativas entre as freqüências de micronúcleos dos grupos tratados e os controles. Desta forma apesar da colchicina ser um agente indutor de danos à estrutura mitótica, pelo menos nas concentrações utilizadas e especificamente na espécie de peixe utilizada não foi possível detectar a presença de micronúcleos.

Neste trabalho os autores indicam o número de micronúcleos espontâneos encontrado nas carpas usadas como controle. Este número difere do indicado por outros autores para a mesma espécie. A tabela 01 mostra alguns valores encontrados como micronúcleos espontâneos em diferentes espécies de peixes.

TABELA 1 – MICRONÚCLEOS ESPONTÂNEOS ENCONTRADOS EM ERITRÓCITOS DE PEIXES (POR 1000 CÉLULAS) REGISTRADOS POR DIFERENTES AUTORES EM DIFERENTES ESPÉCIES.

Faixa de freqüências de micronúcleos(em 1000 eritrócitos)	Espécies	MN freqüências (em 1000 células) <sup>(1)</sup>
13 – 1,0	<i>Cyprinus carpio</i>	6,2
	<i>Esox lucius</i>	5,3
	<i>Carassius auratus</i>	13 – 10 – 5,2
	<i>Cyprinus carpio</i>	1,2
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1
	<i>Rutilus rutilus</i>	13 – 3
	<i>Perca fluviatilis</i>	10 – 9
0,9 – 0,09	<i>Phoxinus phoxinus</i>	0,3 – 0,7
	<i>Poecilia latipinna</i>	0 – 0,4
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,33
	<i>Umbra limi</i>	0,14
	<i>Carassius auratus</i>	0,18
0,09 – 0,00	<i>Umbra pygmaea</i>	0
	<i>Barbus plebeius</i>	0,05
	<i>Cyprinus carpio</i>	0,02

FONTE: GUSTAVINO, B.; SCORNAJENHI, K. A.; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. (2001). Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X – Ray and colchicine. **Mutation Research**. v. 494, p. 155.

(1) Os autores são citados no trabalho original.

Como ficam evidenciadas pela análise da tabela, algumas espécies, apresentam discordâncias no número de micronúcleos espontâneos encontrados por diferentes autores. Como exemplo cita-se a espécie *Cyprinus carpio*, a qual aparece com freqüências de micronúcleos em uma faixa que vai de 6,2 a 0,02 em mil células.

Para Porto, Araújo e Feldberg (2005) o nível trófico ocupado pela espécie no habitat influencia o número basal de micronúcleos. Para estes autores, espécies piscívoras tendem a ter um maior número destas estruturas em função dos fenômenos de biomagnificação que ocorre na cadeia alimentar.

Gustavino *et al.* (2001), embora tenham encontrado alterações morfológicas nos núcleos não as consideraram em seu trabalho, pois entendem que estas alterações são ambíguas quanto a sua importância como eventos genotóxicos.

Ayllon e Garcia – Vazquez (2000), avaliaram os micronúcleos e outras anormalidades nucleares em eritrócitos renais de *Phoxinus phoxinus* e *Poecilia*

*latipinna* com a intenção de contribuir para a padronização do teste do micronúcleo em peixes. Os autores analisaram as alterações morfológicas nucleares, classificando-as basicamente em quatro categorias: Notched, Lobed, Blebbed e Vacuolated, segundo as descrições fornecidas por Carrasco, Tilbury e Myers (1990).

Neste ensaio foram injetados intraperitonealmente colchicina (10 mg/kg), mitomicina C (20 mg/kg), ciclofosfamida (40 mg/kg), cloridrato de cádmio e nitrato de mercúrio (0,17; 1,7; 2 x 1,7 e 3,4 mg/kg) em grupos separados das duas espécies de peixes. Além do que os autores analisaram o efeito do protocolo de administração injetando solução salina (NaCl 0,9%) em grupos de ambas as espécies.

Alguns dos resultados encontrados pela análise dos micronúcleos e alterações na morfologia dos núcleos foram:

- Diferenças significativas no número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares entre os expostos a mitomicina C e colchicina e os seus controles.
- Diferenças significativas no número de alterações morfológicas nucleares e *não significativas* no número de micronúcleos entre os expostos a ciclofosfamida e os seus controles.
- Na exposição ao cádmio não foram encontradas diferenças significativas no número de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares em três dosagens administradas (0,17; 1,7 e 3,4 mg/kg). Somente no grupo exposto a dosagem de 2 x 1,7 mg/kg foram observadas diferenças significativas, no número de alterações morfológicas nucleares e não significativas quanto ao número de micronúcleos, isto ocorrendo em ambas as espécies.
- Na exposição ao mercúrio uma das espécies estudadas (*Phoxinus phoxinus*) não mostrou diferenças significativas no número de micronúcleos ou de alterações morfológicas nucleares em nenhuma das concentrações utilizadas deste metal tóxico.

- O grupo da espécie *Poecilia latipinna*, que recebeu o mercúrio na concentração de 0,17 mg/kg, apresentou diferenças significativas no número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. Já o grupo que recebeu este composto na concentração de 1,7 mg/kg apresentou diferenças altamente significativas *para as alterações morfológicas nucleares, mas não para os micronúcleos.*

Não ocorreram diferenças significativas no número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares entre os animais que receberam a solução salina intraperitonealmente e os controles.

Alguns autores atribuem a origem destas alterações morfológicas nucleares a problemas durante a segregação dos cromossomos eventualmente emaranhados e agregados ou ainda da amplificação gênica no ciclo ponte-quebra-fusão e a posterior eliminação do DNA amplificado destes cromossomos (ERGENE, *et al.* 2007).

Embora estas alterações já estivessem sendo observadas a algum tempo, não lhes era atribuída nenhuma origem genotóxica. A partir dos anos 2000, muitos autores começaram a levar em consideração estas alterações por perceberem que elas apareciam com mais freqüência em peixes coletados em locais poluídos ou submetidos à bioensaios com metais tóxicos e agrotóxicos. Atualmente, estas alterações são também computadas junto com a freqüência de micronúcleos em muitos trabalhos de monitoramento ambiental (ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2003; FERRARO *et al.* 2004; ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2005 a; Da SILVA SOUZA; FONTANETTI, 2006; MATSUMOTO *et al.* 2006)

Além dos eritrócitos dos peixes, outras células também podem ser usadas na detecção de micronúcleos, tais como células das brânquias, fígado, rins e células das escamas dos peixes. Neste último exemplo, são realizados pequenos cortes nas membranas interradiais das nadadeiras e posteriormente as células são coletadas. Como as células proliferativas estão em contato direto com água é sugerido que este ensaio seja muito útil na avaliação de contaminação aquática, tendo a vantagem

assim como na análise dos eritrócitos de não ser necessário o sacrifício dos animais (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005).

Como fica evidenciado, apesar do teste de micronúcleo ser bem estabelecido em camundongos, nos peixes muitos aspectos deste protocolo necessitam de um refinamento. O conhecimento de fatores como a duração do ciclo dos eritroblastos, o tempo requerido para sua maturação e aparecimento na circulação e seu tempo de vida devem ser considerados. Deve-se salientar que o rim cefálico é o principal, mas, não o único órgão hematopoiético dos peixes. O sangue circulante, no entanto, recebe eritrócitos de vários órgãos hematopoiéticos e conseqüentemente eventuais eritrócitos com micronúcleos não originados a partir do rim cefálico. Além destes fatores, também devem ser consideradas as diferenças inter-específicas e desta forma novos ensaios com estes organismos devem ser realizados, uma vez que, ainda estamos muito distantes da total compreensão dos mecanismos envolvidos na formação dos micronúcleos e das anormalidades da morfologia nuclear (UDROIU, 2006).

### 1.10 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO COM LARANJA DE ACRIDINA (LA)

O teste do micronúcleo com a utilização da Laranja de Acridina (LA) é uma variação do teste do micronúcleo písceo normalmente executado. A LA cora seletivamente os eritrócitos imaturos ou jovens (eritrócitos policromáticos – PCEs) diferentemente dos maduros (eritrócitos normocromáticos - NCEs). Esta possibilidade existe em função da capacidade da LA ser capaz de se ligar tanto ao DNA quanto ao RNA, mas sob fluorescência pode-se distinguir nitidamente com quem a LA esta ligada. Ao se ligar ao DNA, emite fluorescência intensa de cor amarelo esverdeada e quando ligada ao RNA, emite fluorescência intensa de cor avermelhada (ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2005 b; McGAHON et al. 1995).

Os eritrócitos jovens ainda possuem em seu citoplasma grandes quantidades de RNA, desta forma, apresentarão um núcleo com intensa fluorescência amarelo esverdeada e seu citoplasma fluorescência avermelhada. Enquanto que os eritrócitos maduros não apresentarão esta coloração avermelhada em seu citoplasma pela ausência de RNA (ÇAVAS; GÖZÜKARA, 2005 b).

O uso da LA é especialmente útil, pois a maioria dos peixes possui cromossomos muito pequenos. Deste modo as eventuais quebras cromossômicas ou mesmo cromossomos inteiros, os quais são a origem dos micronúcleos, podem eventualmente, passarem despercebidos quando se utiliza a coloração com Giemsa (UEDA et al., 1992).

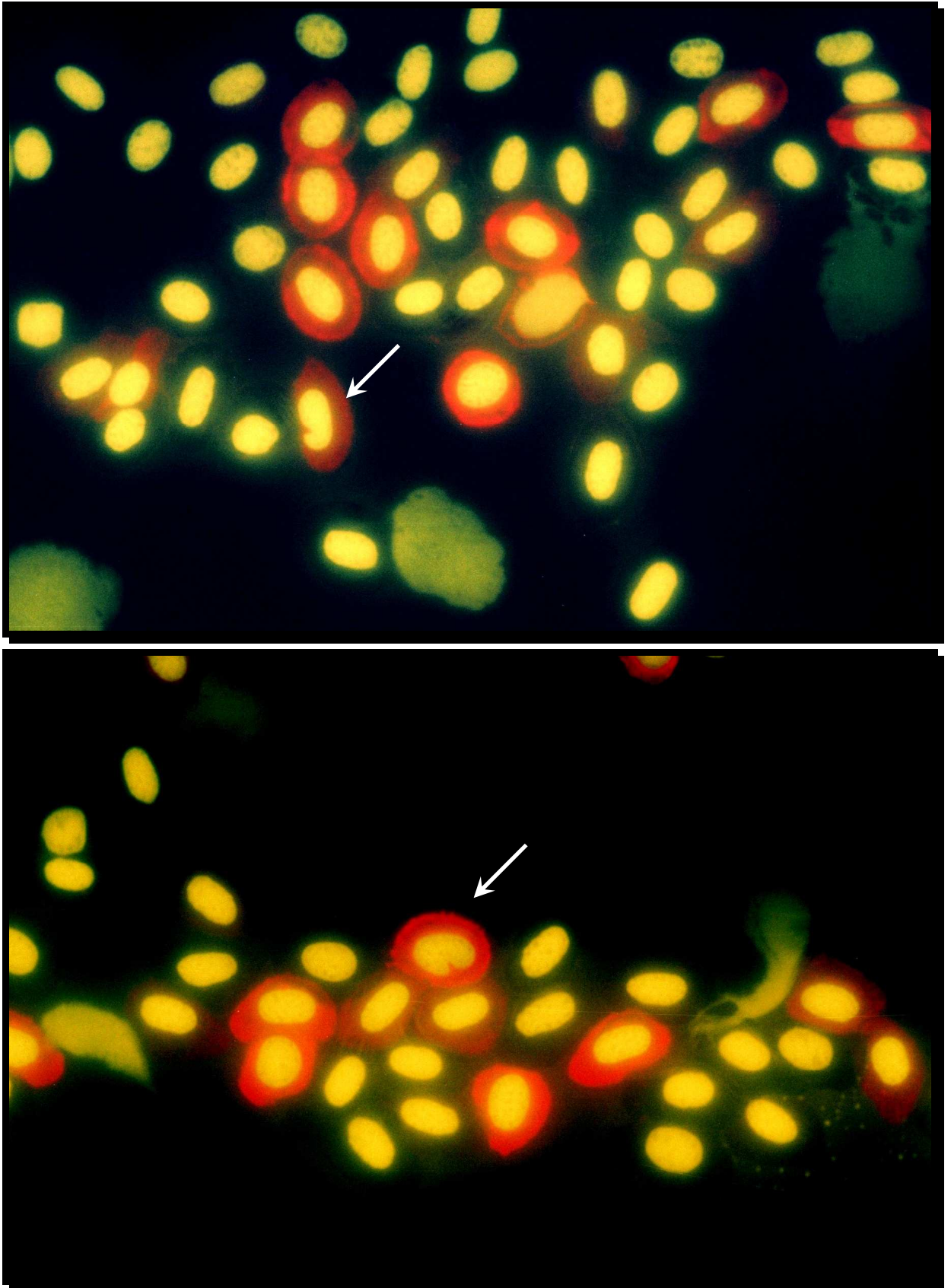


FIGURA 1 - AS SETAS INDICAM ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen* COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. CÉLULAS CORADAS COM LARANJA DE ACRIDINA. (1000X)

Fonte: O autor (2008)

### 1.11 O ENSAIO COMETA

O Ensaio Cometa, também conhecido como SCGE (Single-Cell Gel Electrophoresis), é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas. As células nas quais se deseja verificar o dano ocasionado ao seu DNA, são suspensas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e então colocadas em lâminas de vidro para microscopia as quais foram previamente recobertas com uma camada de agarose normal. As lâminas contendo as células são então submetidas a uma corrida de eletroforese (SPEIT; HARTMANN, 1999).

O DNA contido em células de organismos eucariotos possui alguns centímetros de comprimento. Para que o DNA seja acomodado no interior do núcleo que possui entre 5  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  de largura, este DNA tem que ser fortemente condensado. Danos impostos à molécula de DNA provocam um relaxamento desta condensação e ocasionalmente quebras na estrutura molecular (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; COLLINS *et al.* 2008).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração adequada). Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; COLLINS *et al.* 2008).

As quebras detectadas pelo ensaio podem ocorrer em virtude da digestão do DNA no processo de apoptose. Para OLIVE, BANÁTH e DURAND (1990), as células que se encontram neste processo são distinguíveis das outras, pois não apresentam um nucleóide típico, estando todo seu DNA fragmentado.



Várias são as metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA. Uma das medidas utilizadas na avaliação deste dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão da “cauda” (*Tail length*) formada pelo DNA em migração (classificados como Classe 0 – nenhum dano, até Classe 4 – máximo dano). Outra forma de medir o dano é a distribuição do DNA na cauda. A partir destas medidas outras foram sendo incorporadas na quantificação dos danos ao DNA. Alguns exemplos são: *Cell area*, *Comet coefficient of variance*, *Comet distribution moment*, *Comet extent*, *Comet optical intensity*, *Head optical intensity*, *Tail mode*, *Tail mean*, entre outras (KUMARAVEL; JHA, 2006; KUMARAVEL *et al.* 2007).

Destas análises, o comprimento da cauda em relação ao diâmetro do nucleóide pode ser medido visualmente. As outras necessitam de programas de análise.

Programas de análise de imagem são excelentes ferramentas que podem quantificar os danos sofridos pelo DNA sob diferentes parâmetros. No entanto, muitos destes programas são vendidos apenas junto com a marca específica de microscópio adquirido. Outros, apesar de funcionarem bem com qualquer equipamento têm como fator limitante o alto custo. Para contornar estes inconvenientes existem programas de domínio público que rodam sob diferentes plataformas e sob diversos sistemas operacionais (Linux, Windows 2000, NT, XP) que permitem a análise das imagens de cometas (KUMARAVEL; JHA, 2006; KUMARAVEL *et al.* 2007).

A imagem obtida do cometa tem uma forma complexa. Após a visualização esta imagem pode ser codificada pelos programas de captura e análise de imagem em um conjunto de dados que representam a figura. Estes programas são capazes de coletar uma grande quantidade de informações a partir destas imagens então traçando uma série de mensurações (LOWELL; OMORI, 2008).

De maneira geral todos os programas comerciais e de domínio público permitem ainda que as análises possam ser feitas á partir de imagens de vários formatos (JPEG, TIFF)

Uma visão mais detalhada destes programas e das maneiras de quantificar o dano ao DNA através do ensaio cometa, estão disponíveis no endereço [www.cometassay.com](http://www.cometassay.com); onde além de informações sobre a técnica e seus parâmetros existe um fórum de discussão sobre as aplicações desta técnica.

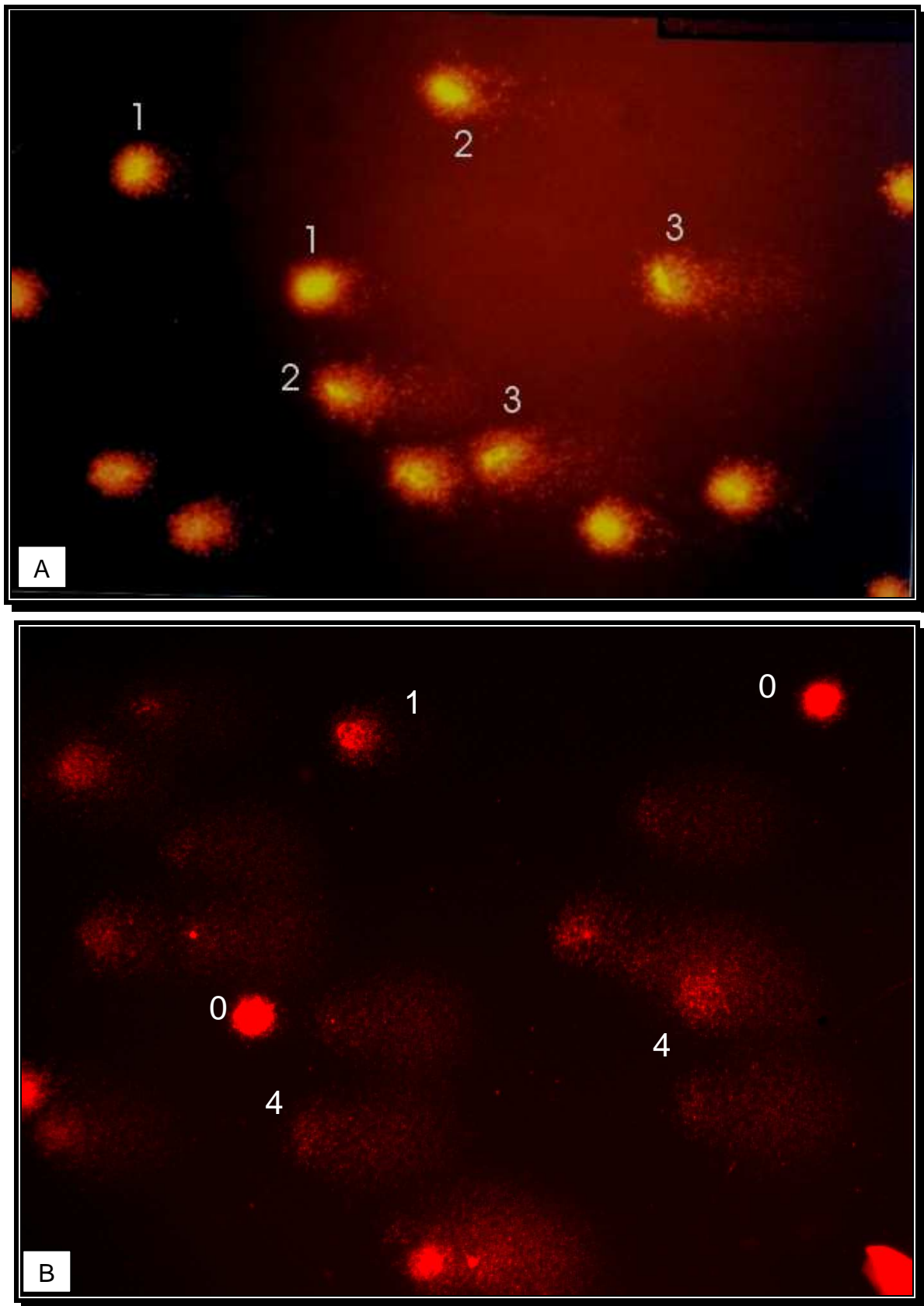


FIGURA 2 – ERITRÓCITOS DE *Cyprinus carpio* (A) E *Rhamdia quelen* (B). OS NÚMEROS NAS FOTOS A E B INDICAM A CLASSE DE DANO DE CADA UMA DAS CÉLULAS (NUCLEÓIDES).

Fonte: O autor (2008)

Este ensaio é de fácil execução, custo relativamente baixo, com boa reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade. Além de apresentar as características citadas, este ensaio permite obter resultados a partir de poucas células e os dados são extraídos de cada célula individualmente, podendo ser usado para avaliar danos em células em experimentos *in vitro* ou *ex vivo* (MONTEITH, VANSTONE, 1995; SASAKI *et al.*, 1997; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; KUMARAVEL *et al.* 2007).

Ao contrário de outros tipos de ensaio como o dos micronúcleos (MN), de aberrações cromossômicas (AC) ou de trocas de cromátides irmãs (SCE) que necessitam de células em proliferação para sua viabilidade, o Ensaio Cometa não necessita desta condição podendo ser utilizado em, virtualmente, qualquer tipo de célula (PADRANGI *et al.*, 1995; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Uma vez que, substâncias genotóxicas, muito freqüentemente, são tecido específicas, ficam evidentes as vantagens do uso do Ensaio Cometa. Como já citado anteriormente este ensaio não depende da proliferação celular. Então, o tecido alvo do agente genotóxico pode ser analisado diretamente, sendo que as células danificadas, podem ser quantificadas individualmente (PADRANGI *et al.*, 1995).

Rydberg e Johanson<sup>1</sup>, citados por Rojas, Lopez e Valverde (1999, p. 226), foram os primeiros a quantificar o dano sofrido pelo DNA em células individualizadas. Misturaram uma suspensão celular com agarose e colocaram esta mistura sobre uma lâmina. Esta foi então colocada em uma solução de lise sob condições alcalinas brandas. Como corante utilizaram o corante Laranja de Acridina. Com o auxílio de um fotômetro quantificaram o dano no DNA. As quebras em fita dupla têm coloração vermelha e as quebras em fita simples coloração verde. As variações de tonalidade entre estas cores indicam a quantidade de quebras de um tipo ou de outro.

Ostling e Johanson (1984), desenvolveram a eletroforese em lâmina com gel chamada então de Ensaio Cometa devido à forma característica tomada pelo DNA,

---

<sup>1</sup> RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. (1978). Estimation of single strand break in single mammalian cells in : P. C. Hanawalt, E. C. Friedbers, C. F. Fox (Eds). **DNA Repair Mechanisms**. New York. p. 465.

que sofreu o processo de migração ao final da aplicação deste ensaio. Nesta técnica, as células eram misturadas a agarose de baixo ponto de fusão e depositadas sobre uma lâmina com agarose normal. Sofriam então um processo de lise por detergentes e soluções salinas altamente concentradas. Isto permitia a liberação do DNA. As lâminas eram então submetidas a eletroforese em tampão neutro. Esta técnica apresentava algumas limitações, pois só era capaz de detectar quebras de fita dupla no DNA e ainda poderia ser confundido com o RNA ainda presente no núcleo (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

SINGH *et al.* (1988), com a intenção de verificar danos no DNA ocasionados por Raios – X e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), desenvolveram uma variação da técnica anteriormente descrita, utilizando-se de um tampão de eletroforese com pH superior a 13. Com esta modificação é possível detectar no DNA as quebras em fita simples, os sítios álcali – lábeis e sítios de reparo tardio. Esta é a versão conhecida por SCGE e por motivos históricos com o nome de Ensaio Cometa.

Olive, Banáth e Durand (1990), modificaram alguns parâmetros da técnica de Ostling e Johanson (1984). Neste caso a lise das células é feita em meio alcalino e a eletroforese é executada em meio neutro ou alcalino (pH 12,3).

Embora as técnicas descritas por Olive, Banáth e Durand (1990) e Singh *et al.* (1988), sejam idênticas em princípio e similares na prática, o método desenvolvido por Singh parece ser pelo menos duas vezes mais sensível na capacidade de detectar danos (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Os locais do DNA que são suscetíveis ao processo de alquilação são mais sensíveis a degradação. Estes pontos, onde a depurinação está aumentada, transformam-se em pontos de quebras da fita de DNA sendo, portanto, visíveis através do Ensaio Cometa (HAHN e HOCK, 1999).

As condições de pH da solução de lise e do pH do tampão de eletroforese onde ocorre o relaxamento da molécula de DNA influem no tipo de dano a ser visualizado, bem como nas características do cometa obtido. Sob condições neutras (pH 7,5) os cometas apresentam caudas mais densas enquanto que sob condições

alcalinas ( $\text{pH} > 10$ ) são mais dispersas. Em meio alcalino as caudas são mais curtas e mais intensamente coradas, enquanto que em meio pouco alcalino ( $\text{pH} 10 - 11$ ), são mais longas e coram-se mais fracamente (KLAUDE *et al.*, 1996).

O Ensaio Cometa realizado sob condições alcalinas, permite a detecção de quebras em fita simples do DNA e sob condições não desnaturantes a detecção de quebras de fita dupla do DNA (OLIVE *et al.*, 1992; OLIVE; BANÁTH, 1995). Estima-se que com cerca de 200 quebras na fita de DNA, de uma célula, o teste mostre sua sensibilidade. Este número de quebras é muito menor do que qualquer outro método para detectar danos ao DNA existente atualmente. (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Já para OLIVE *et al.* (1998) podem ser detectados pelo ensaio a partir de 50 quebras em uma das fitas do DNA de células diplóides.

As quebras de fita simples, detectadas pelo método alcalino (SCGE), resultam de vários tipos de reações como: reparo por excisão de nucleotídeos ou de bases; excisão direta das proteínas estruturais do DNA por agentes químicos ou físicos; excisão seguida de intercalação de agentes químicos na estrutura do DNA; ação de endonucleases ou topoisomerasas entre outros (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; HORVÁTHOVA *et al.*, 1998).

O papel da lise no Ensaio Cometa é o de remover os conteúdos celulares, com exceção do material nuclear. O DNA permanece bem condensado devido à presença de uma pequena quantidade de proteínas não histônicas. Porém, quando colocado na solução de eletroforese, a qual possui um pH maior que 13, a espiralização do DNA começa a relaxar a partir dos pontos de quebra da fita. Permitindo desta maneira que os mesmos sejam revelados pela eletroforese na seqüência do teste (YENDLE *et al.*, 1997; COLLINS *et al.*, 1997; KLAUDE *et al.*, 1996).

Yendle *et al.* (1997), trabalhando com queratócitos de camundongo e hepatócitos de roedores observaram que o tempo de permanência na solução da eletroforese para permitir o relaxamento da estrutura do DNA, pode influir muito nos parâmetros de análise das caudas dos cometas. Indicam ainda em seus resultados,

que os agentes que afetam, unicamente, as proteínas da superestrutura do DNA, podem aumentar o comprimento das caudas, embora não estejam afetando diretamente o DNA. Desta forma existiriam duas classes de substâncias que promoveriam resultados idênticos no Ensaio Cometa, mas que teriam implicações diversas como agentes genotóxicos.

Collins *et al.* (1997, 2008) enfatizam que o DNA não migra em fragmentos como na eletroforese convencional, onde a distância percorrida é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento. Destaca ainda que as distâncias entre as quebras originadas e detectadas pelo ensaio estão na ordem de  $10^9$  Da, muito além da faixa detectável pela eletroforese convencional. Nesta, o comprimento dos fragmentos está na ordem de 1 mm enquanto que a cauda de um cometa mede um centésimo deste valor. Outro fato importante destacado por estes autores é o de que mesmo após o tratamento com a solução de lise e a solução salina da eletroforese, o núcleo ou nucleóide, tem uma estrutura. Esta estrutura mantém os nucleossomos; desta maneira a figura da cauda do cometa seria um relaxamento da superespiralização do DNA originadas pelos danos à estrutura do DNA.

Como o Ensaio Cometa analisa as células individualmente, estas têm que ser individualizadas. Por esta razão surgem algumas limitações de ordem prática que devem ser consideradas. Na separação das células, a partir de seu tecido original, através de processos de fragmentação ou através do uso da tripsina podem ocorrer incrementos no número de quebras do DNA. Outra consideração a ser feita é a de que incrementos no número de quebras podem estar associados a situações de estresse (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Em outras palavras, ao se escolher o tecido ou células que servirão como unidades no ensaio estas devem ser convenientemente separadas por meios que não causem danos a estas células, mas que permitam a individualização delas. No caso de células sangüíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em uma solução fisiológica. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos

adicionais ao DNA possam ocorrer. Desta maneira, as células devem ser manipuladas ao abrigo da luz, uma vez que esta causa danos ao DNA.

Além destes aspectos, devem-se considerar os mecanismos de reparo próprios do DNA, os quais podem estar atuando antes da análise do material em estudo. Com o uso de substâncias como a citosina- $\beta$ -D-arabinofuranosina que inibem a ação da DNA polimerase e da ligase, foi demonstrado um incremento na freqüência das quebras detectadas pelo ensaio (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Ressalve-se que sob o aspecto do reparo do DNA, os organismos aquáticos e no caso específico dos peixes, os mecanismos de reparo do DNA são mais lentos do que nas células de mamíferos (ESPINA; WEISS, 1995).

Embora as condições ideais para incrementar a sensibilidade do Ensaio Cometa dependam do agente a ser testado, das células que serão utilizadas e da maneira de obtê-las para o ensaio, danos ao DNA podem ser detectados, mesmo com curtas exposições ao agente genotóxico. Monteith e Vanstone (1995) detectaram dano ao DNA em hepatócitos de ratos expostos por um período de duas horas a dimetilnitrosamina (DMNA) e logo em seguida analisados.

Uma vez que células individualizadas podem ser observadas, torna-se possível, com este ensaio, verificar se todas as células de uma determinada população têm a mesma quantidade de danos e ainda se, os mecanismos de reparo do DNA, dentro de uma determinada população celular ocorrem na mesma freqüência. Desta forma, subpopulações de células podem ser identificadas (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; OLIVE; BANÁTH, DURAND, 1990; OLIVE *et al.*, 1992).

Dentro desta linha de raciocínio, Olive *et al.* (1998) afirmam que, como muitos tratamentos antitumorais produzem danos ao DNA, o Ensaio Cometa parece ser a escolha ideal para caracterizar a heterogeneidade tumoral e predizer a resposta dos tecidos normais e tumorais à terapia.

Comparativamente com outros ensaios de genotoxicidade o Ensaio Cometa parece ser mais sensível. Testes de troca de cromátides irmãs (SCE) realizados no



acompanhamento de ex-fumantes mostraram divergências nos resultados obtidos junto àqueles indivíduos que pararam de fumar há poucas semanas. Neste particular, o Ensaio Cometa mostrou-se mais sensível do que o SCE em revelar os efeitos do cigarro nestes grupos (BETTI *et al.*, 1995).

Para Frenzilli *et al.* (1997), que acompanharam um grupo de fumantes por um ano, o fator sensibilidade foi determinante na escolha do Ensaio Cometa para a realização do seu trabalho.

A técnica do Ensaio Cometa originalmente desenvolvida para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos, mostrou-se de grande eficiência na detecção de substâncias genotóxicas em organismos do ambiente aquático, além de encontrar amplo emprego na área clínica em estudos de reparo do DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano.

Sasaki *et al.* (1997), utilizando-se de dois moluscos marinhos com conchas, *Patunopekten yessoensis* e *Tapes japonica*, demonstraram por meio do Ensaio Cometa que estes animais são excelentes bioindicadores de poluição aquática

Hanh e Hock (1999), trabalhando com fungos da espécie *Sardaria macrospora* analisaram o efeito de duas substâncias ( $H_2O_2$  e 4-nitroquinilona-1-óxido) além da radiação UV sobre esta espécie. O fato que chamou a atenção, neste trabalho, foi o de que os organismos testados cresceram diretamente nas lâminas de agarose que foram levadas à eletroforese.

Utilizando-se pela primeira vez do Ensaio Cometa em peixes para avaliar os efeitos da Aflotoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), ABD-ALLAH *et al.* (1999), demonstraram que esta substância foi capaz de provocar danos extensos no DNA dos diferentes tipos de tecidos analisados da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). No entanto, em outra espécie utilizada, o catfish (*Ictalurus punctatus*), não encontraram diferenças significativas entre o grupo tratado e o controle.

Padrangi *et al.* (1995), utilizando-se dos peixes *Ameiurus nebulosus* e *Cyprinus carpio*; Ferraro *et al.* (2004) analisando o efeito do chumbo inorgânico (PbII) e do tributilestanho (TBT) em traíras (*Hoplias malabaricus*) e Cestari *et al.*

(2004) também utilizando-se de traíras, demonstraram a grande eficiência do ensaio no monitoramento de águas através dos peixes.

No caso específico do Ensaio Cometa realizado com os peixes, o sangue revela-se um tecido potencialmente útil no biomonitoramento ambiental. Em primeiro lugar, por ser um material que pode ser obtido de uma maneira pouco invasiva e em segundo lugar por apresentar em sua composição, aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e 3% de leucócitos. Garantindo, desta forma, uma substancial homogeneidade no tecido. Embora os leucócitos sejam mais sensíveis à ação de agentes genotóxicos do que os eritrócitos, esta sensibilidade pode ser mascarada pelo grande número de eritrócitos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; THEODORAKIS; SURNEY; SHUGART, 1994).

Uma vantagem adicional na utilização do sangue dos peixes é a de que são necessárias quantidades mínimas de amostras para a realização do ensaio, menos de 1 ml de sangue são suficientes, podendo ser coletadas várias amostras ao longo do tempo.

Silva *et al.* (2000), trabalhando com roedores, e Navarrete *et al.*, (1997) de um vegetal superior – *Allium cepa* também evidenciaram a utilidade do uso deste ensaio no biomonitoramento ambiental.

A utilização do ensaio também se mostrou muito eficiente na avaliação do efeito protetor de substâncias para as células. Assim Duthiet *et al.* (1997), avaliaram os efeitos protetores de dois flavonóides contra danos induzidos ao DNA por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em linfócitos humanos e Menoli *et al.* (2001), avaliaram o efeito antimutagênico do cogumelo *Agaricus blazei* em células V79. Ambos os trabalhos demonstraram o efeito protetor das substâncias analisadas.

Collins, Ai-Guo e Duthie (1995), utilizando-se de células HeLa e modificando algumas etapas do ensaio conseguiram quantificar uma grande quantidade de locais do DNA onde as bases pirimídicas estavam oxidadas com o auxílio da endonuclease III. Esta enzima converte estes pontos em quebras na fita de DNA.

Embora existam muitos trabalhos realizados com este ensaio e seus protocolos estejam bem estabelecidos em estudos com humanos e muitos mamíferos, no campo da ecotoxicologia e da genotoxicologia com a utilização de organismos aquáticos, notadamente os peixes, a ausência de uma padronização dos protocolos, torna difícil o cruzamento dos dados encontrados em diferentes espécies ou mesmo dentro de uma mesma espécie (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2008).

Ainda que existam críticas pela relevância dos resultados obtidos pelo ensaio no campo da ecotoxicologia é inegável a revolução que o mesmo provocou nesta área. Pela sua simplicidade, rapidez, não necessidade de prévio conhecimento do cariótipo da espécie ou do tempo de renovação celular do tecido utilizado. Sua utilização tem sido tão intensa nos estudos de genotoxicidade que a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) esta desenvolvendo um roteiro de utilização do ensaio em sua versão alcalina (pH>13) para ensaio *in vivo*, e validações dos estudos também *in vivo* estão sendo desenvolvidas pelo Mammalian Mutagenesis Study Group (MMSG/Japanese Center) (JHA, 2008; COLLINS *et al.* 2008).

### 1.12 BIOINDICADORES.

As três espécies utilizadas neste trabalho como bioindicadores foram o jundiá (*Rhamdia quelen*), o lambari (*Astyanax bimaculatus*) e a carpa comum (*Cyprinus carpio*).

O jundiá (Figura 3) é um peixe que pertence à Classe Actinopterygii (raios nas barbatanas), Ordem Siluriformes e família Heptapteridae. Atingem tamanho de 35 cm. Suporta variações de pH na faixa de 6,0 – 7,5 e temperaturas na faixa de 18°C a 30°C. Possui hábitos noturnos, preferindo ficar junto ao fundo onde pode se misturar as folhas e galhos caídos. Vive em profundidades de 0 a 3 m, alimentando-se de invertebrados aquáticos e terrestres. É um peixe de movimentos lentos e suaves. Tem distribuição pela América do Sul e Central.



FIGURA 3 – EXEMPLAR DE *Rhamdia quelen*

Fonte: Fishbase

Os lambaris (Figura 4) são peixes que pertencem à Classe Actinopterygii, Ordem Characiformes e família Characidae. São animais que atingem até 15 cm de comprimento. São potamódromos, isto é, realizam ao longo de suas vidas migrações entre diferentes massas de água doce. Vivem em rios e riachos com pouca correnteza, lagos e lagoas com profundidades que variam de 0 a 3 m. Suportam variações de pH em uma faixa de 5,5 a 7,5 e temperaturas na faixa que vai de 20 °C a 28 °C. Alimentam-se de detritos e de zooplâncton. Tem sua distribuição por toda América do Sul. São animais que nadam ativamente e de hábitos diurnos (CASTRO; CASATTI, 1997).



FIGURA 4 – EXEMPLAR DE *Astyanax bimaculatus*

FONTE: Fishbase

As carpas (Figura 5) pertencem à Classe dos Actinopterygii, Ordem Cipriniformes e família Cyprinidae. Atingem comprimentos de até 120 cm. São potamódromos, suportando variações de pH na faixa de 7,0 – 7,5 e temperaturas na faixa de 3 °C a 32 °C. Tem hábitos alimentares omnívoros e sua distribuição atualmente é global. É um animal que suporta grandes variações ambientais (KOTTELAT, 1997).



FIGURA 5 – EXEMPLAR DE *Cyprinus carpio*

FONTE: Fishbase

### 1.13 ANESTESIA DOS PEIXES

No manejo dos peixes em muitas ocasiões é necessária a manipulação do animal para, por exemplo, aferições de tamanho, peso e presença de parasitas. Em alguns casos, para obter o sangue, este é coletado através de uma punção cardíaca ou da veia caudal. Via de regra, este procedimento é realizado sem anestesia. Evidentemente este procedimento além de causar dor e desconforto aos animais sob estudo, dificulta o manejo e a coleta dos dados ou do material para os estudos. Para contornar este inconveniente no manejo dos animais é recomendável o uso de anestésicos. Destes, os mais comumente utilizados são a tricaína metano sulfonato (MS-222), o 2 – fenoxietanol, o eugenol (conhecido como óleo de cravo por ser extraído a partir do cravo da Índia) o mentol e a benzocaína. Os mais seguros, quanto a manipulação, baratos e fáceis de obtenção são os três últimos (GOMES, *et al.* 2001).

Na sedação dos peixes deve-se levar em conta o tempo necessário para o anestésico agir e o tempo necessário para a recuperação completa dos animais. Estes são fatores que dependem diretamente das concentrações dos anestésicos utilizados e do tempo de exposição ao mesmo. Variações nestes parâmetros (notadamente nas concentrações) permitem modular o tempo necessário para uma completa sedação e recuperação do animal (FAÇANHA; GOMES, 2005).

Considera-se o animal como sedado a partir do momento em que cessam os movimentos branquiais e recuperado quando o seu movimento natatório esta completamente normalizado (GOMES, *et al.* 2001).

Tanto o mentol com a benzocaína foram testadas em tambaquis (*Colossoma macropomum*) juvenis e mostraram-se muito eficientes tanto na capacidade anestésica quanto na possibilidade de recuperação pós – anestésica. A benzocaína mostrou-se eficiente em concentrações que variaram de 50 mg a 350 mg/l, com tempo de indução da sedação variando conforme a concentração de 8 min a menos de 1 min. Os tempos de recuperação foram de 2 min a mais de 30 min, também em

função da concentração utilizada. Os melhores resultados obtidos com este anestésico foram obtidos na faixa de concentração de 100 a 150 mg/l. Nesta faixa de concentração, mesmo os exemplares colocados por de 30 min na solução anestésica puderam se recuperar não ocorrendo nenhuma morte entre eles (GOMES, *et al.* 2001; FAÇANHA; GOMES, 2005).

Em função da alta sensibilidade do Ensaio Cometa, se faz necessário o uso de um anestésico que não cause danos adicionais ao material genético. Caso estes danos ocorram em função da atuação do anestésico isto poderia levar a uma interpretação errônea dos resultados obtidos.

O MS-222 mostrou-se um potencial indutor de danos ao DNA, possivelmente por conter em sua estrutura molecular o metano sulfonato, o qual faz parte da molécula do metilmetanosulfonato (MMS), usado freqüentemente como controle positivo em ensaios de genotoxicidade. Já o uso da benzocaína não induz dano adicional no Ensaio do Cometa (GONTIJO, *et al.* 2003).



## 2 OBJETIVOS

### **Geral:**

**Avaliar** o potencial como bioindicadores de três espécies de peixes neotropicais *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, frente a possíveis agentes genotóxicos.

### **Específicos:**

**Avaliar** o efeito genotóxico do Roundup (glifosato), do Folicur (tebuconazole) e uma mistura dos dois em *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus* (Pisces) através de:

- 1) Frequência de micronúcleos (MN) e Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) em hemácias periféricas.
- 2) Ensaio Cometa de lesões induzidas ao material genético de hemácias periféricas.
- 3) Percentual de hemácias normocromáticas e policromáticas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 BIOINDICADORES UTILIZADOS

Os organismos utilizados foram peixes das espécies *Rhamdia quelen* (jundiá), *Cyprinus carpio* (carpa) e *Astyanax bimaculatus* (lambari). Foram obtidos 320 exemplares de cada espécie de pisciculturas situadas na região da cidade de Toledo no oeste do Paraná com venda em entreposto localizado na Central de Abastecimento (CEASA) de Curitiba.

Cada uma das espécies utilizadas, após o período de aclimação de no mínimo dez dias foi submetida a bioensaios de exposição por via hídrica.

Um bioensaio foi a exposição ao agrotóxico Folicur® nas concentrações de 0,4 e 0,8 mg/l. Para cada uma das concentrações ocorreu exposição por períodos de 5, 10 e 15 dias.

Também foram realizados bioensaios de exposição ao Roundup®, nas concentrações de 1,58 mg/l e de 3,16 mg/l. Os períodos de exposição foram de 5, 10 e 15 dias em cada uma das concentrações.

Outro bioensaio foi realizado utilizando-se uma mistura dos dois agrotóxicos nas concentrações mais altas (Folicur® 0,8 mg/l e Roundup® 3,16 mg/l) pelos períodos de 5, 10 e 15 dias.

Para cada espécie existiu um grupo de 20 indivíduos como controle negativo. Este último grupo foi mantido sob as mesmas condições de temperatura, luz, pH que os grupos tratados. O Quadro 1 mostra o desenho dos experimentos.

Exposição e espécies utilizadas	Xenobionte	Concentração (mg/l)	Tempo de exposição (dias)	Numero de exemplares	Total de cada espécie	
Hídrica <i>Rhamdia quelen</i> , <i>Astyanax bimaculatus</i> e <i>Cyprinus carpio</i>	Folicur®	0,4	5	20	120	
			10	20		
			15	20		
		0,8	5	20		
			10	20		
			15	20		
	Roundup®	1,58	5	20	120	
			10	20		
			15	20		
		3,16	5	20		
			10	20		
			15	20		
	Folicur® + Roundup®	0,8 + 3,16	5	20	60	
			10	20		
			15	20		
	Grupo Controle			15	20	20
	Total de exemplares utilizados de cada espécie					320

QUADRO 1 – DESENHO DO EXPERIMENTO MOSTRANDO AS DOSES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DAS ESPÉCIES UTILIZADAS NOS BIOENSAIOS

### 3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Após a coleta, os animais foram mantidos por 15 dias para aclimação em tanques de 250 litros abastecidos com água proveniente da rede de abastecimento comum (Figura 6). Esta água passava previamente por um sistema de filtros de carvão ativado para a retirada do cloro e por dois filtros de nitrocelulose (1 e 5  $\mu$ ) para a retirada de impurezas. A temperatura foi mantida em torno de 27 °C com aeração constante.

Após este período os exemplares foram sendo transferidos para os aquários de 100 litros sob as mesmas condições anteriores (Figura 7). Em cada aquário foram colocados 22 animais que permaneceram nestes por mais sete dias para nova aclimação. Durante todo o período de aclimação os animais foram alimentados com ração comercial.



FIGURA 6 – TANQUES DE 250 LITROS UTILIZADOS NA ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS.

FONTE: O autor (2007)

### 3.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Decorrido o período de aclimação os bioensaios tiveram início. Os animais foram expostos aos xenobióticos por via hídrica conforme quadro já apresentado. A cada 48 h do bioensaio 1/3 da água do aquário é retirada e repostada com concentração proporcional do xenobionte ao volume de água trocada. Com este procedimento garante-se a manutenção da concentração do xenobionte que poderia sofrer processo de degradação com o tempo e também a eliminação de uma parte dos catabólitos gerados pelos peixes. O ensaio foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.



FIGURA 7 – UM DOS AQUÁRIOS DE 100 LITROS ONDE FORAM EXPOSTOS OS PEIXES AOS XENOBIONTES.

FONTE: O autor (2007)

Do total de exemplares de cada espécie (*Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*) que fizeram parte do bioensaio, 20 foram utilizados como controle (15 dias), 120 expostos ao Folicur (5, 10 e 15 dias em duas concentrações diferentes), 120 ao Roundup (5, 10 e 15 dias em duas concentrações diferentes) e 60 (5, 10 e 15 dias) a uma mistura de ambos os agrotóxicos na maior concentração testada de cada um.

### 3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DE MATERIAL PARA CADA BIOENSAIO.

Todo o procedimento de coleta do material foi realizado no período matutino entre 7h30 e 10h para assegurar a continuidade dos procedimentos no período vespertino. Antes da retirada do sangue os peixes foram anestesiados da seguinte maneira: colocados em um aquário que continha 2 litros de água na qual foram acrescentados 20 ml de solução alcoólica de benzocaína a 1,5%, isto no caso dos jundiás e carpas. No caso dos lambaris a concentração foi de 1%, para permitir um processo de anestesia mais suave.

Após a verificação do processo de sedação os animais foram pesados, medidos e imediatamente após a coleta do sangue foram colocados em outro recipiente com a mesma solução anestésica para o aprofundamento da sedação por no mínimo mais 30 minutos até a morte.

Com o auxílio de uma seringa heparinizada foi retirado aproximadamente 1 ml de sangue periférico através de punção da veia caudal (Figura 8). Após a extração do sangue este foi armazenado em ependorfes as quais havia sido adicionado previamente 1 ml de soro bovino fetal. Imediatamente após a colocação do sangue os ependorfes foram mantidos no escuro e refrigerados até sua utilização. Cerca de 10 µl de sangue foi imediatamente colocado sob uma lâmina limpa previamente identificada e procedeu-se então a realização de um esfregaço com o auxílio de uma lamínula.

As gônadas, quando necessário, foram identificadas no momento de retirada dos órgãos para a correta identificação dos sexos dos exemplares. Este procedimento não foi necessário com os jundiás e lambaris, uma vez que, podem ser identificados quanto ao sexo por aspectos morfológicos externos.



FIGURA 8 – A FOTO MOSTRA O PONTO JUNTO A NADADEIRA ANAL DE ONDE FOI COLHIDO O SANGUE PARA OS ENSAIOS.

FONTE: O autor (2003)



### 3.5 TESTE DOS MICRONÚCLEOS

Para análise dos micronúcleos (MN) foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973), com algumas modificações que consistem das seguintes etapas:

- Imediatamente após se coletar o sangue do peixe, foi colocado aproximadamente 10 µl em lâmina de vidro bem limpa.
- Em seguida com o auxílio de uma lamínula foi feito um esfregaço. Este permaneceu secando em temperatura ambiente por um período de no mínimo 12h.
- Após esta secagem procedeu-se a fixação, que foi feita com a imersão das lâminas em etanol absoluto por 20 minutos.
- As lâminas foram então coradas com Giemsa 5% diluída em tampão fosfato a pH 6,8, por 8 minutos. Decorrido este tempo as lâminas foram lavadas suavemente sob uma torneira para a retirada do excesso de Giemsa e deixadas a temperatura ambiente para secar. Após a secagem as lâminas foram acondicionadas e guardadas em caixas próprias, para serem analisadas posteriormente.
- O Teste de Micronúcleos foi realizado pela análise de 2.000 hemácias, incluindo no computo total, aquelas que apresentavam os micronúcleos e aquelas com alterações morfológicas nucleares, sob aumento de 1000x ao microscópio de campo claro.

### 3.6 ENSAIO COMETA

Esta técnica descrita por Singh *et al.* (1988) com algumas modificações consistiu de várias etapas descritas a seguir:

- O sangue total de cada animal ( $\pm 1$  ml) foi coletado e colocado em microtubo de centrífuga do tipo ependorfe. Este tubo permaneceu sob refrigeração e no escuro até ser realizado o ensaio.
- Foram coletados 10  $\mu$ l de sangue de cada tubo e misturados com 1 ml de soro bovino fetal. Coletou-se então 10  $\mu$ l desta solução e misturou-se gentilmente com 120  $\mu$ l de agarose LMP. Esta suspensão foi então depositada sob uma lâmina previamente preparada com agarose normal.
- *Preparação das Lâminas com agarose normal:*
- Dissolveu-se agarose normal (1,5 g em 100 ml de PBS) em um erlemeyer deixando-se em agitação por duas horas. Esta mistura foi fervida em microondas por cerca de 50 s e agitada até a sua dissolução total.
  - A agarose foi deixada para solidificar em temperatura ambiente. Após a solidificação, esta agarose foi totalmente picada e novamente levada para ferver em microondas. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desta operação a agarose foi mantida em banho maria a 70 °C.
- As lâminas, previamente limpas, foram mergulhadas na agarose quente e retiradas vagarosamente desta solução. Um dos lados da lâmina foi então limpo com lenço de papel.
- As lâminas foram deixadas em superfície plana e à temperatura ambiente *overnight* para solidificar a camada de agarose e depois guardadas em geladeira.
- *Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)*
  - Para a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) foram utilizados 100 mg, desta agarose em 20 ml de PBS. Com somente uma etapa de fervura como na agarose normal. Quando de seu uso esta agarose foi

aquecida até se liquefazer em microondas e mantida a 37 °C em banho maria.

- A mistura agarose (120 µl) + sangue (10 µl) foi colocada sobre a lâmina com agarose normal, coberta com lamínula e acondicionada em refrigerador durante 10 min. Evitando-se, durante todo o processo, exposição à luz direta, a qual pode ocasionar danos adicionais ao DNA.
- Após os 10 min em geladeira as lamínulas foram gentilmente retiradas.
- As lâminas foram então acondicionadas em cubetas porta-lâminas onde foi adicionada a solução de lise previamente refrigerada (4 °C) e mantidas no escuro. As lâminas foram deixadas nesta solução na geladeira durante uma hora. As lâminas assim preparadas poderiam ser estocadas por períodos de até quatro semanas desde que permanecessem nesta solução. Caso ocorresse precipitação da solução de lise, as lâminas poderiam ser lavadas gentilmente em PBS antes da eletroforese.
- Após o tempo de lise as lâminas foram removidas gentilmente da cubeta e transferidas para a cuba de eletroforese.
- As lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal preenchendo o máximo possível, todos os espaços vazios; quando necessário estes espaços foram preenchidos com lâminas limpas.
- A cuba foi colocada em uma caixa plástica para permitir que fosse colocado gelo em volta da cuba. Este procedimento visa manter todo o processo de desespiralização do DNA e a própria corrida em uma temperatura de  $\pm 4$  °C.
- Na cuba de eletroforese foi adicionada suavemente a solução de eletroforese (pH>13) de maneira a cobrir todas as lâminas com uma fina camada de solução.
- Antes do início da corrida as lâminas ficaram na solução de eletroforese por 25 min, para permitir a desespiralização do DNA.

- Passado este tempo teve início a corrida de eletroforese a 25 v e 300 mA, estes valores são ajustados removendo ou adicionando a própria solução de eletroforese. O tempo de corrida foi de 25 min.
- Após a eletroforese as lâminas foram retiradas gentilmente e neutralizadas com 5 ml de solução de neutralização. Esta solução é colocada diretamente sobre as lâminas na posição horizontal e deixada por 5 min. Após este tempo é retirada inclinando-se as lâminas. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.
- As lâminas foram colocadas então para secar em temperatura ambiente na posição inclinada.
- Após a secagem, as lâminas foram fixadas com etanol por cinco minutos.
- Para coloração foram adicionados 20 µl de brometo de etídeo em cada lâmina, as quais foram cobertas com lamínulas. Após cinco minutos no escuro, estas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

### 3.7 ANÁLISES DE DANO AO DNA PELO ENSAIO COMETA

Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas foram observadas em aumento 400 x usando microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células de cada lâmina em teste cego.

A avaliação foi feita visualmente de acordo com comprimento da cauda em cinco classes: 0 – sem dano aparente; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano grande e 4 – dano máximo. Procedeu-se então a quantificação dos tipos de danos em cada lâmina e a atribuição de escores em cada classe. Os escores são obtidos multiplicando-se o número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe (MENOLI *et al.*, 2001).

### 3.8 ANÁLISES DE ERITRÓCITOS COM LARANJA DE ACRIDINA (LA)

Estas análises foram realizadas segundo a técnica descrita por Ueda *et al.* (1992) com pequenas alterações.

Do sangue coletado da veia caudal e mantido em ependorf, foram retirados 30  $\mu$ l e colocados sobre a mesma quantidade de soro bovino fetal previamente colocado em uma lâmina de microscopia. Com o auxílio de uma micropipeta o conteúdo total foi gentilmente aspirado e retornado a lâmina por uma melhor homogenização. Procedeu-se então a um esfregaço do material com o auxílio de uma lamínula.

O material foi deixado secando por 24h a temperatura ambiente. Posteriormente estas lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 10 minutos. A coloração foi feita com uma solução de LA a 0,003% em tampão Sorensen's pH 6,8. A análise foi feita imediatamente, uma vez que estas lâminas não podem ser estocadas por muito tempo em função da perda de fluorescência da LA.

Foram computadas 1000 células de cada lâmina anotando-se o número de eritrócitos jovens (policromáticos) com e sem micronúcleos e o de eritrócitos maduros (normocromáticos) com e sem micronúcleos.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Foram utilizados os testes estatísticos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (análises não paramétricas). A escolha do tipo de teste não paramétrico deu-se em função do tipo de avaliação (atribuição de classes) e do comportamento das médias e medianas e conseqüentemente do poder de resolução de um tipo ou outro de análise (CURI; 1998).

Os testes foram realizados com o programa estatístico AnalySoft BioStat – Professional versão 2008 (AnalystSoft, BioStat - statistical analysis program. Version 2008. <http://www.analystsoft.com>).

Todos os testes foram realizados com nível mínimo de significância de 0,05.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESULTADOS DA RELAÇÃO ENTRE ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICOS E POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES

Podemos distinguir facilmente dentre os eritrócitos circulantes, aqueles que são recém formados (policromáticos) daqueles maduros (normocromáticos), através da coloração destas células com a Laranja de Acridina (Figura 9). Com este tipo de coloração é possível também se distinguir as Alterações Morfológicas Nucleares (Figura 10).

O percentual destes eritrócitos jovens é variável entre as espécies e durante a vida do animal. Desta forma ao serem comparados grupos de mesma espécie com as mesmas características etárias e sob as mesmas condições ambientais podemos inferir se o xenobionte em estudo provoca algum tipo de alteração neste biomarcador.

Ao serem analisados mil eritrócitos de cada indivíduo obtêm-se um percentual de eritrócitos policromáticos em relação aos normocromáticos. Estes percentuais foram comparados com o grupo não exposto (controle) e os resultados submetidos a teste estatístico não paramétrico (Mann-Whitney). Os resultados não mostraram discordância no uso destes testes entre si, em função da pequena variação nos desvios padrões obtidos. Os resultados aqui apresentados nas relações entre policromáticos e normocromáticos se referem às análises por testes não paramétricos Mann-Whitney, quando se comparavam apenas duas séries e Kruskal-Wallis quando a comparação era feita com mais de duas séries.

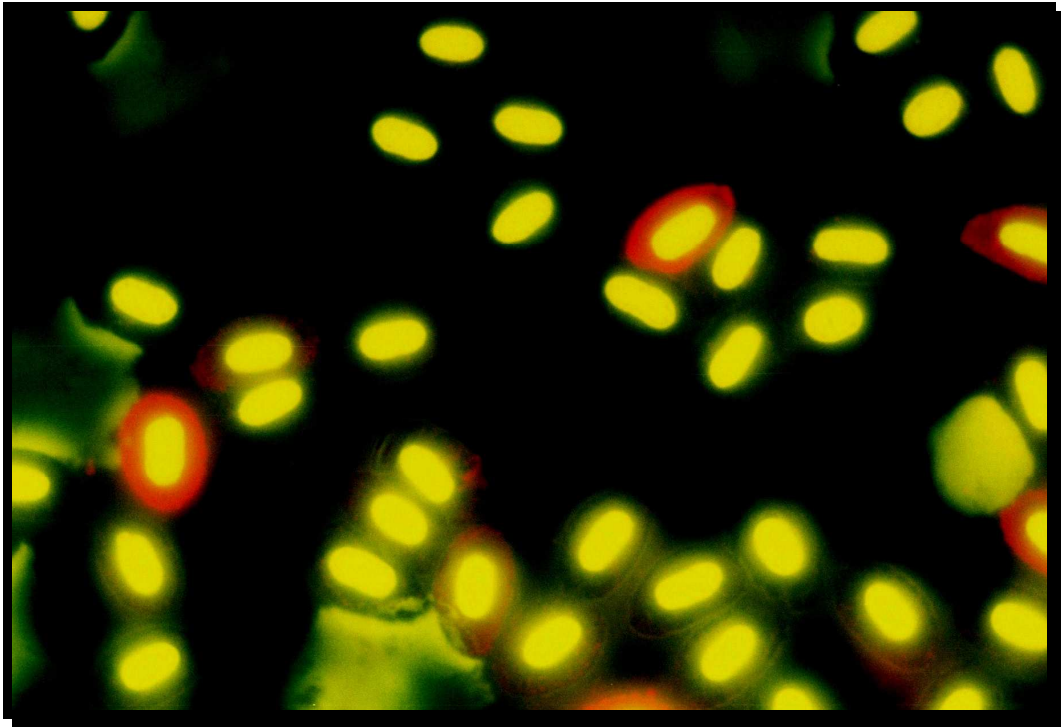


FIGURA 9 – ERITRÓCITOS NORMOCROMÁTICO E POLICROMÁTICOS DE *Rhandia quelen*. OS POLICROMÁTICOS APRESENTAM CITOPLASMA VERMELHO (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA – 1000X)

Fonte: O autor (2008)

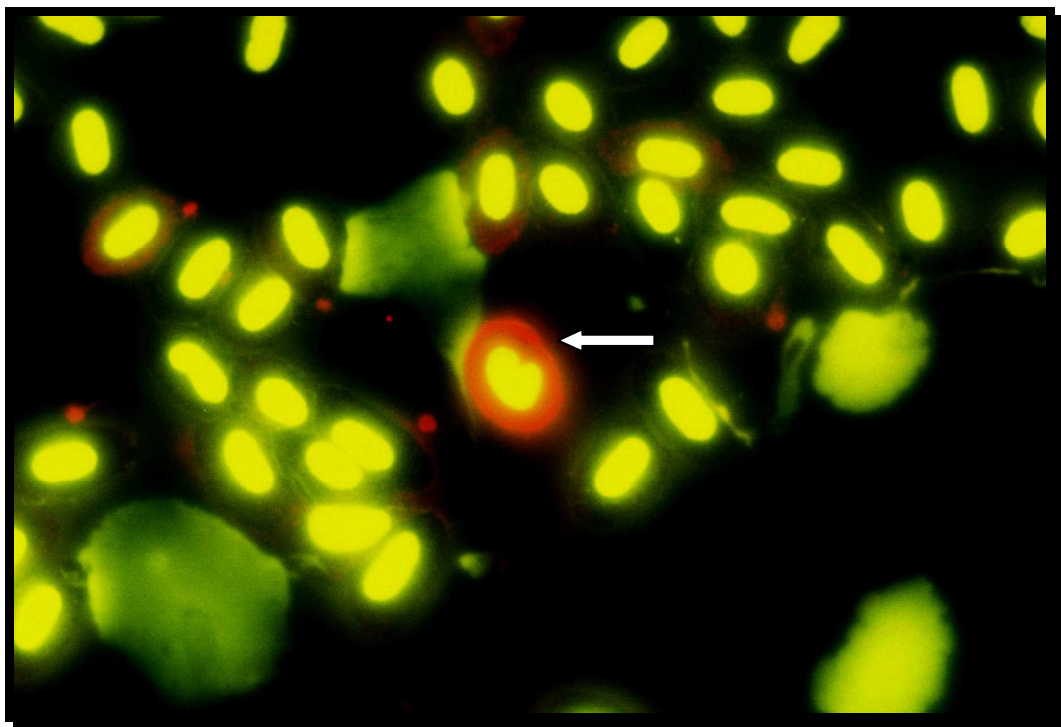


FIGURA 10 – A SETA INDICA ERITRÓCITO POLICROMÁTICO DE *Rhandia quelen* APRESENTANDO ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA NUCLEAR (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA – 1000X)

Fonte: O autor (2008)



#### 4.1.1 Resultados da exposição ao Roundup® Original (1,58 e 3,16 mg/litro).

Os resultados obtidos indicam que no bioensaio de exposição de cinco e dez dias na concentração de 1,58 mg/l o Roundup® não foi capaz de induzir alterações nas frequências de eritrócitos policromáticos em nenhuma das espécies analisadas. No entanto, quando analisada a exposição de 15 dias, duas espécies (*Rhamdia quelen* e *Astyanax bimaculatus*) mostram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), enquanto que a espécie *Cyprinus carpio* neste tempo de exposição não apresentou diferença significativa conforme os dados apresentados na Tabela 02 e Gráfico 1.

TABELA 2 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 1,58 mg/l

	MÉDIA E D. PADRÃO DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	13,07 ± 1,02	12,67 ± 0,59	13,57 ± 1,04
5 dias	12,57 ± 1,02	12,40 ± 0,59	13,12 ± 1,55
10 dias	12,67 ± 0,46	12,52 ± 0,88	13,03 ± 0,85
15 dias	12,55 ± 0,68	12,14 ± 0,79 *	12,82 ± 1,10 *

\* significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ );  
 FONTE: O autor (2008)

No experimento onde foi utilizada a concentração de 3,16 mg/l de Roundup® constata-se que este produto, de alguma forma, inibiu a atividade proliferativa dos tecidos hematopoiéticos, visto que, ocorreram diferenças significativamente menores no número de eritrócitos jovens (policromáticos) presentes na circulação.

O dados na Tabela 3 e Gráfico 1 relativos ao uso do Roundup® em concentração de 3,16 mg/l, indicam que todas as três espécies apresentaram

diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle nos três tempos de exposição.

TABELA 3 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 3,16 mg/l

MÉDIA E D. PADRÃO DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	13,07 ± 1,02	12,67 ± 0,59	13,57 ± 1,04
5 dias	12,40 ± 0,78 *	12,20 ± 0,59 *	12,68 ± 1,37 *
10 dias	12,35 ± 0,63 *	12,24 ± 0,58 *	12,54 ± 0,84 **
15 dias	12,39 ± 0,56 *	11,99 ± 1,22 **	12,53 ± 1,33 *

\* significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ ).

FONTE: O autor (2008)

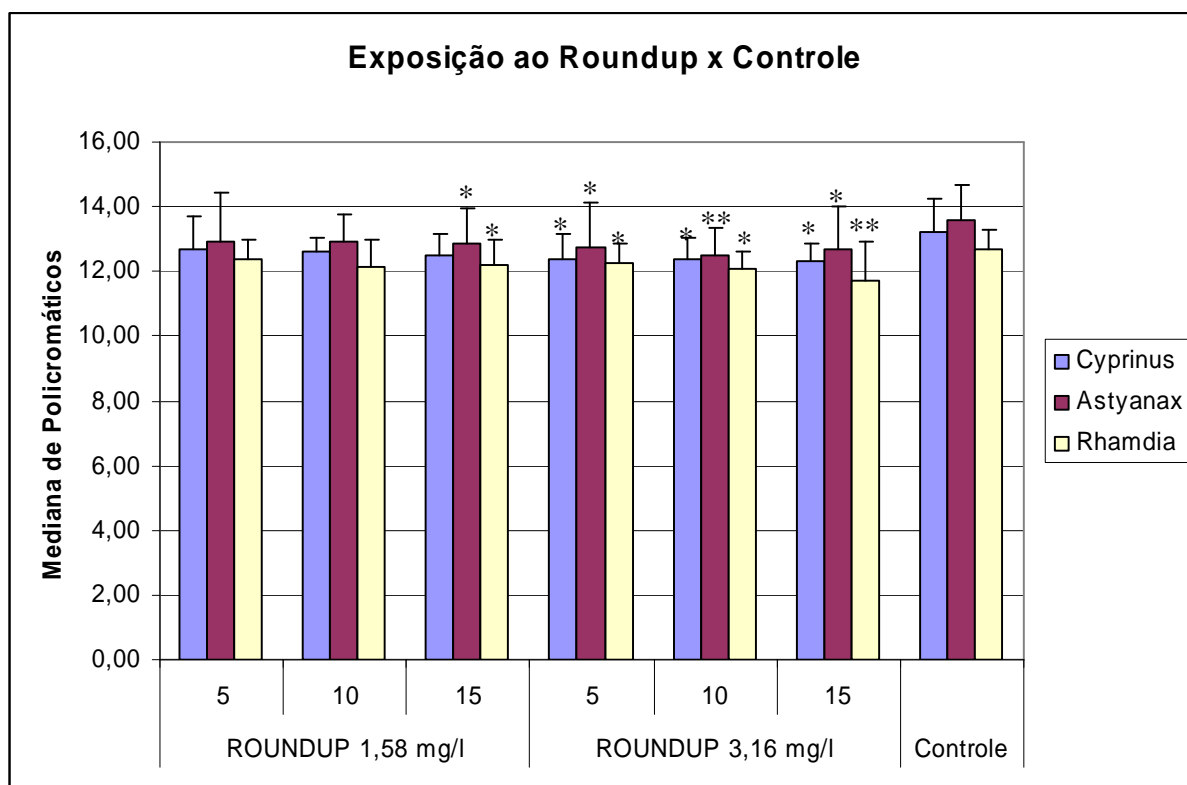


GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO DAS MEDIANAS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS ENTRE OS ANIMAIS EXPOSTOS E SEU CONTROLE.

\* significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ ).

FONTE: O autor (2008)

#### 4.1.2 Resultados da exposição ao FOLICUR® (0,4 e 0,8 mg/litro).

Neste ensaio os resultados encontrados em cinco e dez dias de exposição a uma concentração de 0,4 mg/l do produto, mostram que o xenobionte não teve uma atividade citotóxica sob os tecidos hematopoiéticos de nenhuma das espécies.

No entanto, quando analisados os dados encontrados em 15 dias de exposição à mesma concentração do produto, temos uma das espécies (*Cyprinus carpio*) não sendo sensível e duas espécies (*Rhamdia quelen* e *Astyanax bimaculatus*) com diferença significativa em relação aos seus controles, indicando que para elas, esta concentração e após este período de tempo, ocorreu inibição na formação dos eritrócitos, conforme os dados mostrados na Tabela 4 e Gráfico 2.

TABELA 4 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,4 mg/l

MÉDIA E D. PADRÃO DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	13,07 ± 1,02	12,67 ± 0,59	13,57 ± 1,04
5 dias	13,00 ± 0,73	12,46 ± 1,03	13,00 ± 1,53
10 dias	12,93 ± 0,79	12,37 ± 0,83	13,06 ± 1,14
15 dias	12,94 ± 0,89	12,08 ± 1,01 *	12,69 ± 1,11 *

\* significativa em nível de 5% (p<0,05)

FONTE: O autor (2008)

Os dados encontrados na exposição a concentração de 0,8 mg/l do produto mostram que uma das espécies (*Cyprinus carpio*) só foi sensível em nível significativo após 15 dias de exposição. Outra espécie (*Rhamdia quelen*) foi sensível, em nível significativo, após a exposição por um período de tempo dez e 15 dias. A outra espécie analisada (*Astyanax bimaculatus*) foi sensível, em nível significativo, nos três tempos de exposição. Os dados são mostrados na Tabela 5 e Gráfico 2.

TABELA 5 – MÉDIAS E DESVIOS DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 mg/l

MÉDIA E D. PADRÃO DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	13,07 ±1,02	12,67 ± 0,59	13,57 ± 1,04
5 dias	13,01 ± 0,70	12,46 ± 1,01	12,80 ± 1,30 *
10 dias	12,95 ± 0,87	12,14± 0,91 *	12,77 ± 1,24 *
15 dias	12,25 ± 0,81 *	12,11± 0,86*	12,76 ± 0,82 *

\* significante em nível de 5% (p<0,05)

FONTE: O autor (2008)

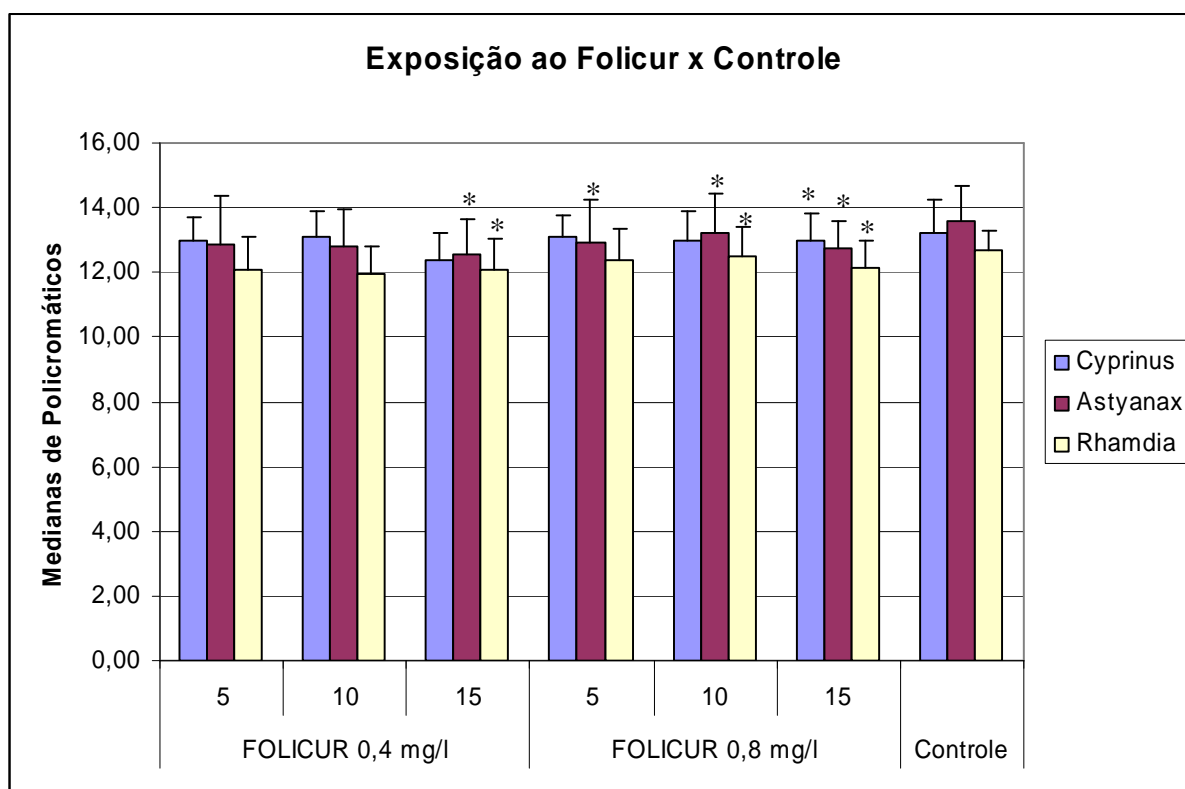


GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES UTILIZADAS COM O GRUPO CONTROLE AS DUAS CONCENTRAÇÕES DE FOLICUR, NOS TEMPOS DE 5, 10 E 15 DIAS.

\* significante em nível de 5% (p<0,05)

FONTE: O autor (2008)

#### 4.1.3 Resultados da exposição ao FOLICUR® (0,8 mg/litro) e ao Roundup® (3,16 mg/l).

As medianas mostradas no Gráfico 3 e as médias na Tabela 6, indicam uma ação conjunta dos dois produtos. Como indicado, em qualquer dos períodos de exposição foi constatada uma diminuição, estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no número de eritrócitos jovens (policromáticos).

Nas três espécies esta diminuição deu-se em nível estatístico significativo na ( $p < 0,05$ ) e muito significativo ( $p < 0,01$ ) em duas espécies (*Rhamdia quellen* e *Astyanax bimaculatus*) nos tempos de exposição de 10 dias e 15 dias respectivamente. Este nível de significância não foi observado em exemplares de *Cyprinus carpio*.

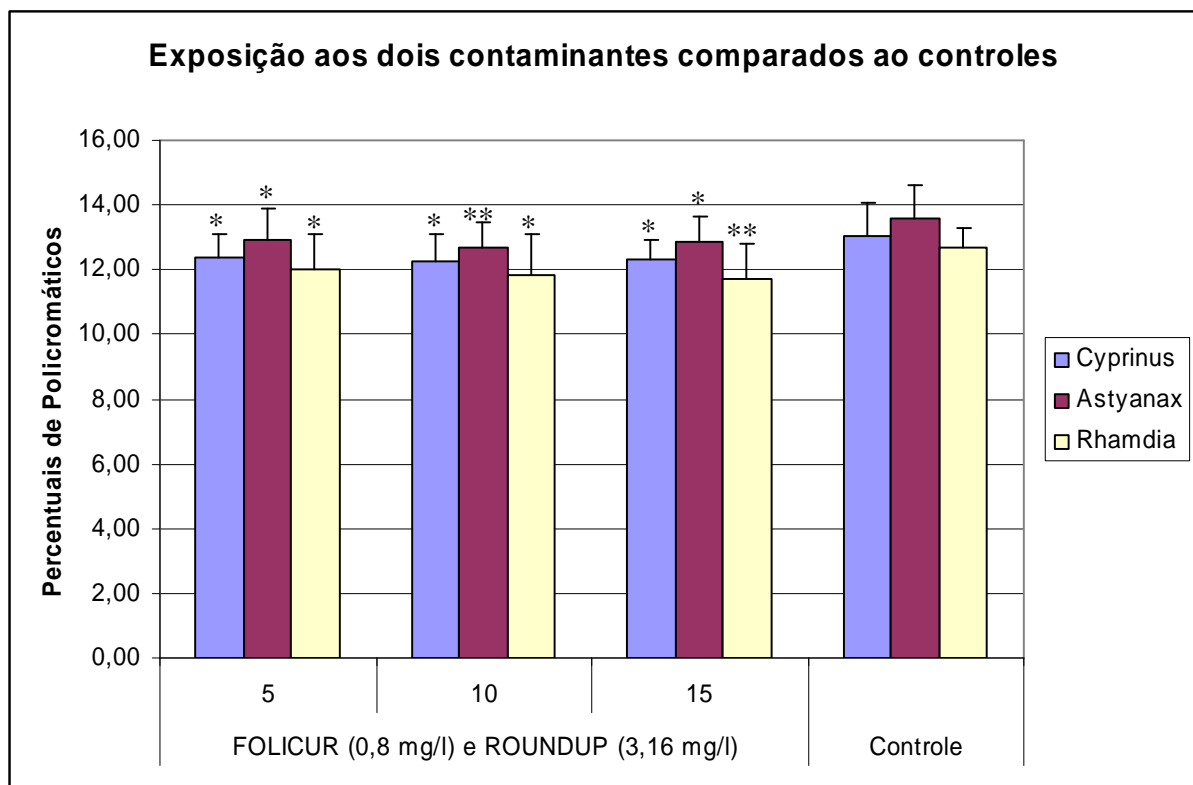


GRÁFICO 3 – RESULTADOS DA EXPOSIÇÃO EM CONJUNTO DOS DOIS CONTAMINANTES COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

\* indica diferença significativa em nível de 5% ( $p < 0,05$ ) e \*\* indica diferença muito significativa ( $p < 0,01$ ).

FONTE: O autor (2008)

TABELA 6 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAAS ESPÉCIES EXPOSTAS A MISTURA DE FOLICUR® 0,8 mg/l E ROUNDUP® 3,16 mg/l

MÉDIA E D. PADRÃO DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	13,07 ±1,02	12,67 ± 0,59	13,57 ± 1,04
5 dias	12,37 ± 0,72*	12,00 ± 1,13*	12,91 ± 0,98*
10 dias	12,28 ± 0,80*	11,83 ± 1,25*	12,65 ± 0,78 **
15 dias	12,35 ± 0,59*	11,72 ± 1,09**	12,89 ± 0,78*

\* significativa em nível de 5% ( $p < 0,05$ ) \*\* indica diferença muito significativa ( $p < 0,01$ ).

FONTE: O autor (2008)

#### 4.2 RESULTADOS REFERENTES AOS MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN)

Os resultados apresentados neste bioensaio levaram em conta a presença em conjunto, tanto dos micronúcleos (MN), mostrados nas figuras 12, 13 e 14 como das Alterações Morfológicas Nucleares (AMN), mostrados nas figuras 11, 15 e 16.

O motivo para que ambos sejam computados em conjunto prende-se ao fato de que o número de micronúcleos encontrados é muito pequeno, mesmo analisando-se duas mil células em cada animal. As freqüências de MN são estatisticamente iguais quando comparados, controle e expostos; não importando a qual dos compostos a espécie tenha sido exposta.

Quando, no entanto, além da observação dos micronúcleos, são computadas as AMN, as diferenças em nível estatístico aparecem. Desta forma, os dados apresentados nas tabelas e gráficos a seguir levam em consideração os dois elementos em conjunto.

Todas as análises estatísticas usadas para estes biomarcadores foram provas não paramétricas.

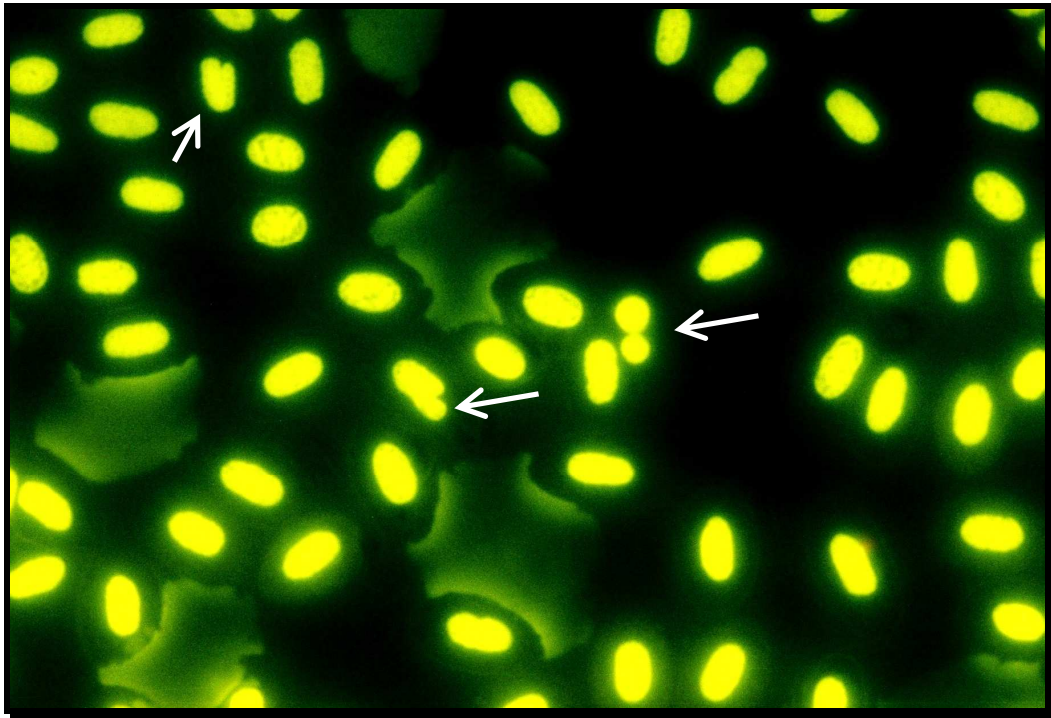


FIGURA 11 - ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen* COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA - 1000X)

FONTE: O autor (2008).

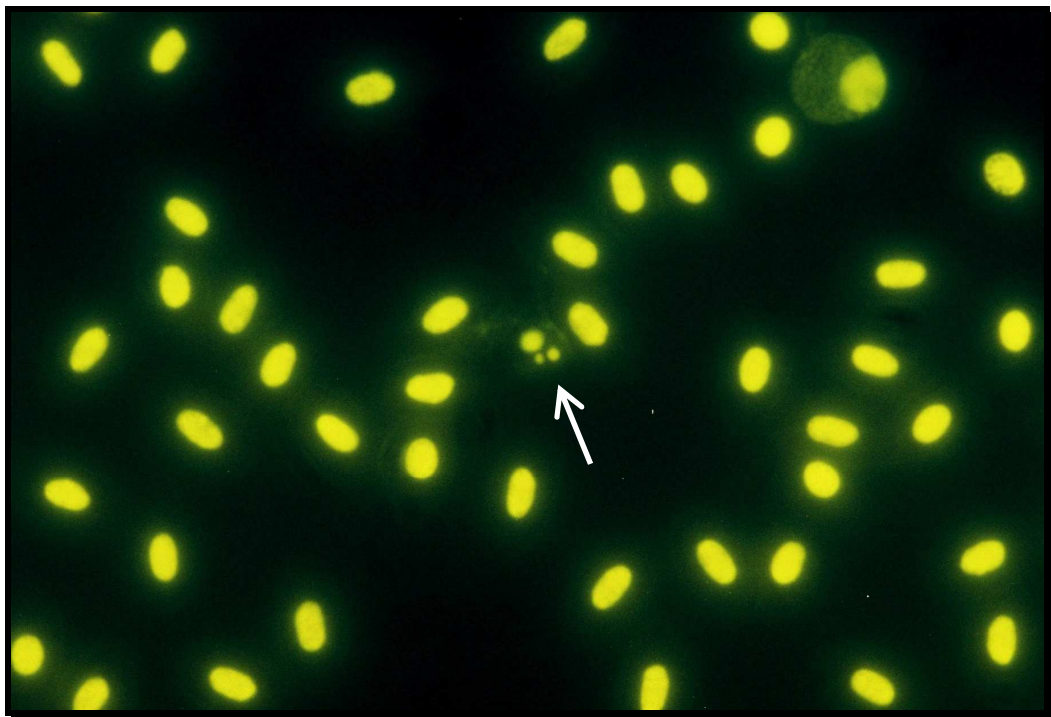


FIGURA 12 - - ERITRÓCITOS DE *Rhamdia quelen*. A SETA INDICA CÉLULA COM DOIS MICRÓNÚCLEOS. (COLORAÇÃO LARANJA DE ACRIDINA - 1000X)

FONTE: O autor (2008).



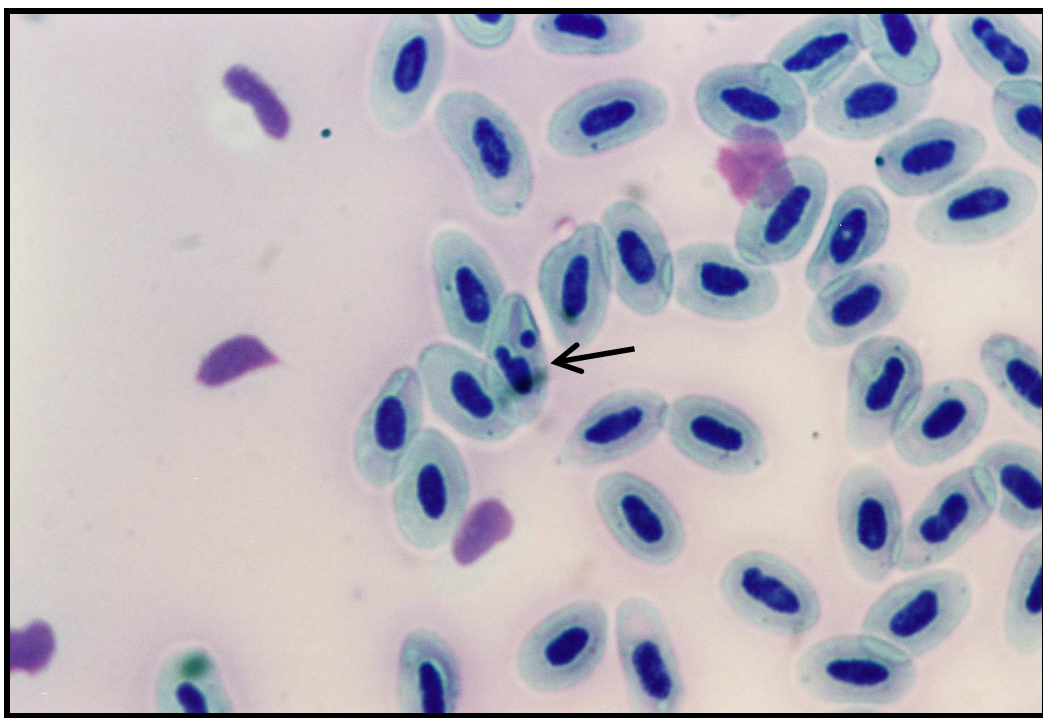


FIGURA 13 – A SETA INDICA ERITRÓCITO DE *Astyanax bimaculatus* COM MICRONÚCLEO (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X)

FONTE: O autor (2007)

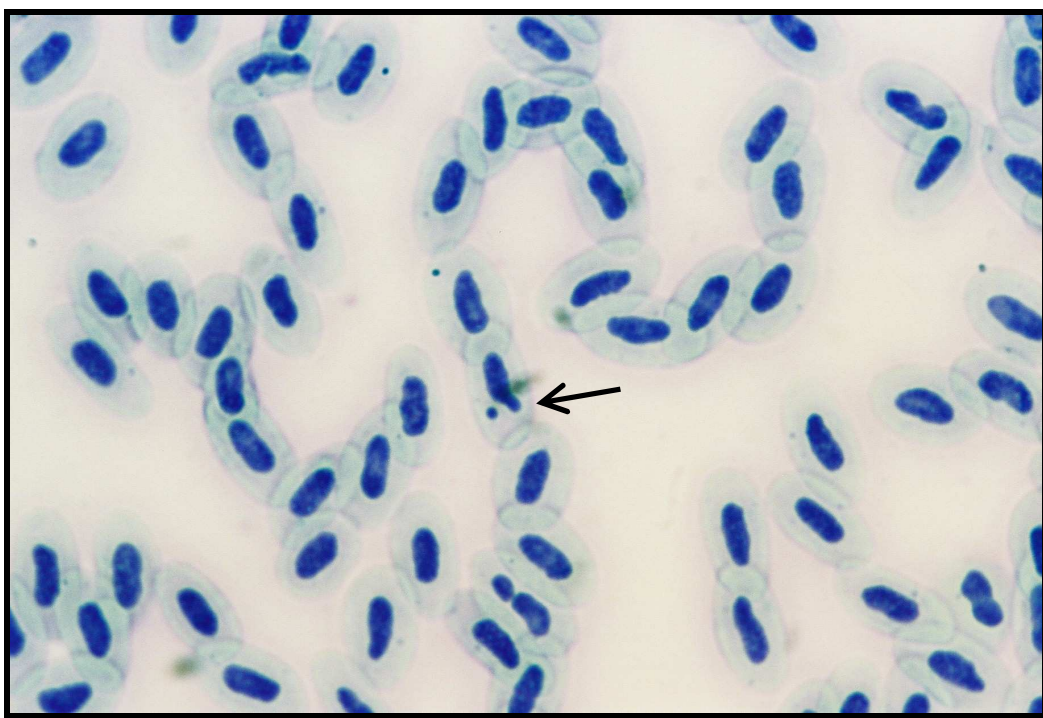


FIGURA 14 – SETA INDICANDO ERITRÓCITO DE *Astyanax bimaculatus* COM MICRONÚCLEO (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X)

FONTE: O autor (2007)

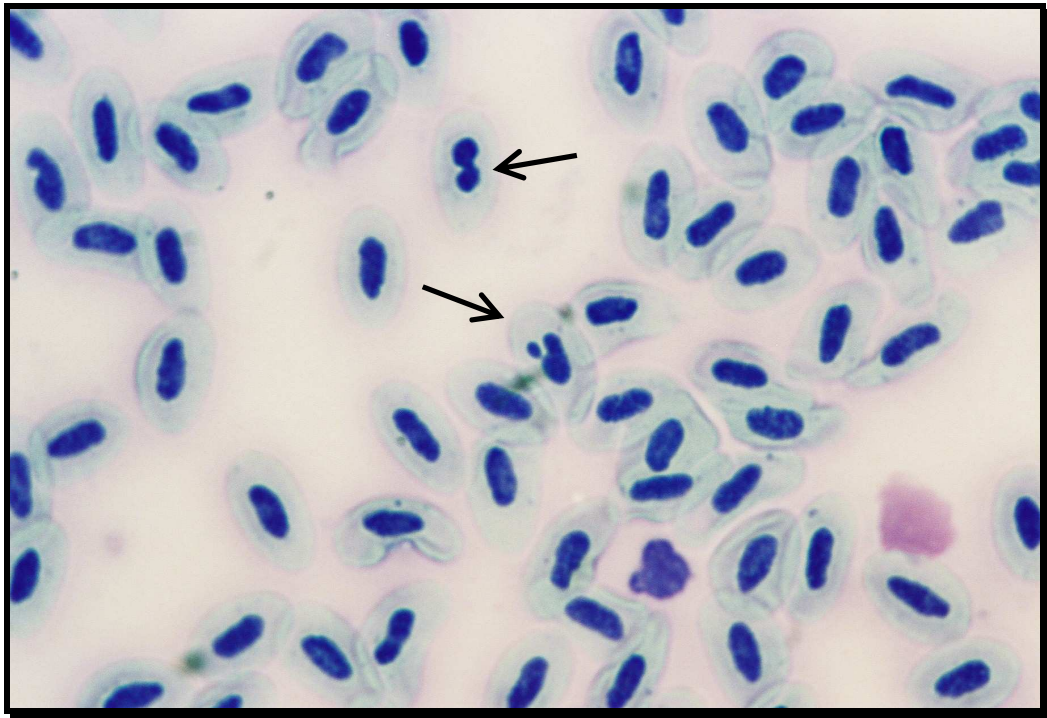


FIGURA 15 - AS SETAS INDICAM ALGUNS ERITRÓCITOS DE *Astyanax bimaculatus* APRESENTANDO ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X)

FONTE: O autor (2007)

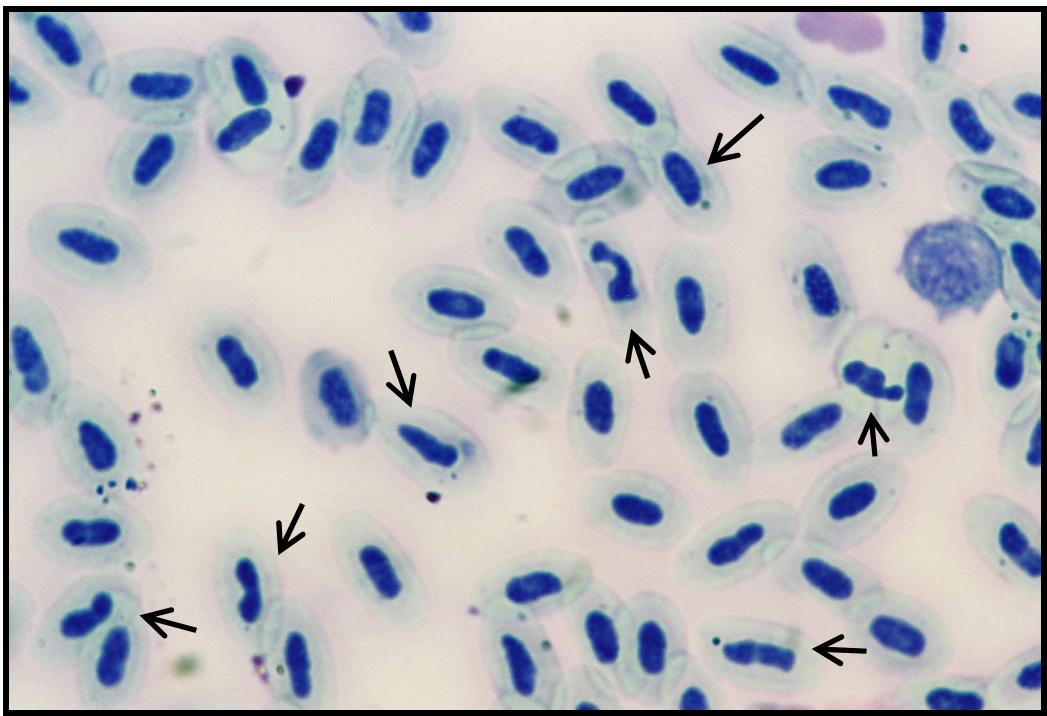


FIGURA 16 - AS SETAS INDICAM ALGUNS ERITRÓCITOS DE *Astyanax bimaculatus* APRESENTANDO ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (COLORAÇÃO GIEMSA – 1000X)

FONTE: O autor (2007)

#### 4.2.1 Resultados da exposição ao Roundup® Original (1,58 e 3,16 mg/litro).

Os resultados observados na análise dos MN e AMN após exposição a concentração mais baixa do Roundup® (1,58 mg/l) indicam que nestas condições não ocorreram alterações significativas nos biomarcadores utilizados como referência. Nenhuma das espécies avaliadas mostrou alteração estatística significativa em relação ao seu grupo controle.

Os dados são mostrados na Tabela 7, onde são disponibilizadas as médias e os desvios padrões obtidos e no Gráfico 4 onde estão disponíveis os valores das medianas obtidas.

TABELA 7 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 1,58 mg/l

	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE MN E AMN		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	2,90 ± 1,59	2,65 ± 1,95	4,10 ± 2,22
5 dias	2,65 ± 1,95	2,90 ± 1,89	4,75 ± 3,24
10 dias	4,15 ± 3,62	3,20 ± 2,65	4,83 ± 2,96
15 dias	2,65 ± 1,53	3,35 ± 2,39	10,45 ± 24,61

FONTE: O autor (2008)

Não deixa de ser curioso observar o resultado obtido com a espécie *Astyanax bimaculatus*, no período de exposição de 15 dias. Apesar de ter uma média muito superior ao grupo controle, não foi constatada diferença significativa. Este aparente contra-senso é explicado pelo tipo de análise estatística.

O teste estatístico não paramétrico compara medianas e atribui postos aos valores encontrados. Como temos um valor obtido muito discrepante em um dos indivíduos analisados (ver planilha de resultados nos anexos), este é praticamente “ignorado” pelo teste e não interfere no computo final.

As médias indicadas na Tabela 8 e as medianas mostradas no Gráfico 4 são os resultados obtidos no ensaio usando a concentração de 3,16 mg/l de Roundup®. Nota-se que apenas a espécie *Cyprinus carpio* mostrou-se sensível ao produto e apenas no tempo de exposição de cinco dias. As demais espécies *Rhamdia quelen* e *Astyanax bimaculatus* não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tempos de exposição. Este resultado indica que pode ter ocorrido algum problema durante o bioensaio com a espécie *Cyprinus carpio*, e que este tenha interferido no resultado obtido.

TABELA 8 - MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 3,16 mg/l

	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE MN E AMN		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	2,90 ± 1,59	2,65 ± 1,95	4,10 ± 2,22
5 dias	5,55 ± 3,58*	3,30 ± 3,01	4,85 ± 3,83
10 dias	3,60 ± 2,48	3,20 ± 1,51	4,70 ± 2,62
15 dias	2,70 ± 1,72	3,40 ± 1,70	4,94 ± 3,25

\* indica significante em nível de 5% (p<0,05)  
 FONTE: O autor (2008)

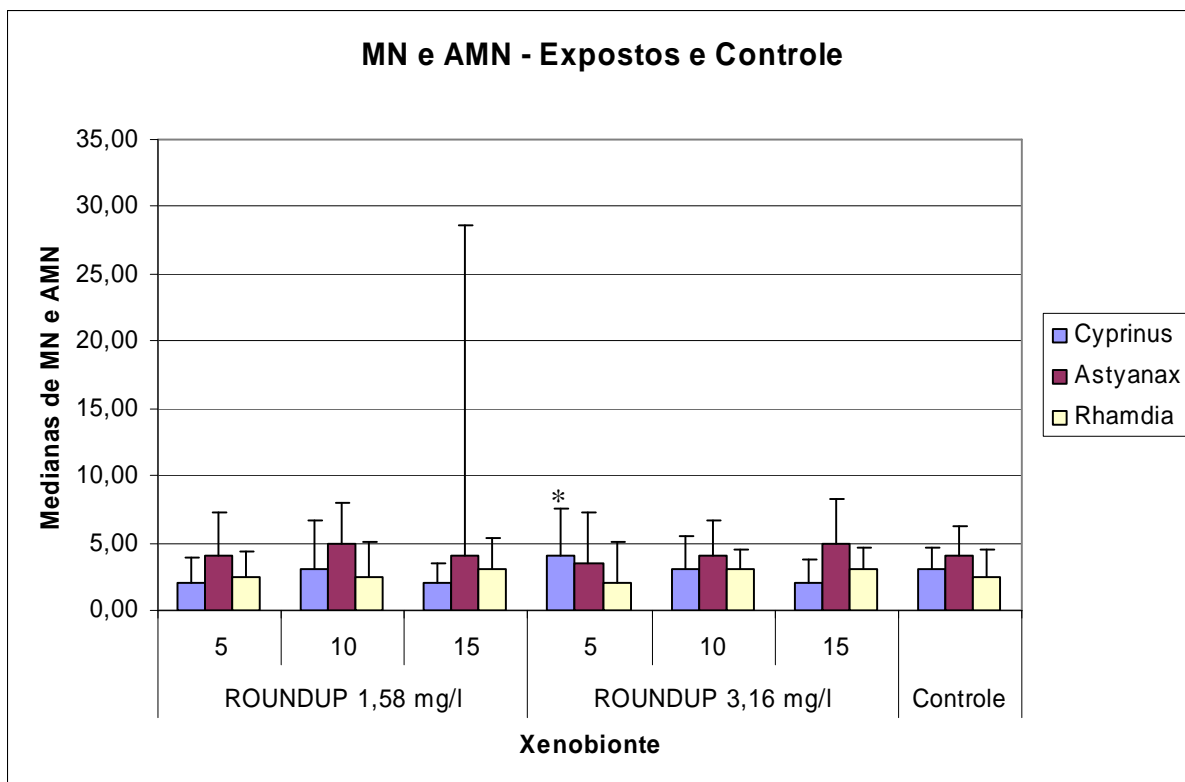


GRÁFICO 4 – MEDIANAS DOS MN E AMN RELATIVAS A EXPOSIÇÃO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE ROUNDUP® EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO.

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2008)

#### 4.2.2 Resultados da exposição ao Folicur® (0,4 e 0,8 mg/litro).

Como resultado da exposição na concentração de 0,4 mg/l do Folicur®, verifica-se que as espécies *Astyanax bimaculatus* e *Cyprinus carpio* não apresentaram sensibilidade ao produto em nenhum dos tempos avaliados na concentração utilizada. Já a espécie *Rhamdia quelen* foi sensível em nível significativo para este biomarcador, apenas após 15 dias de exposição. A espécie não foi sensível com cinco e dez dias de exposição. Dados na Tabela 9 e Gráfico 6.

TABELA 9 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,4 mg/l

	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE MN E AMN		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	2,90 ± 1,59	2,65 ± 1,95	4,10 ± 2,22
5 dias	5,00 ± 3,28	3,35 ± 2,32	6,75 ± 5,32
10 dias	4,25 ± 2,69	3,55 ± 1,47	7,60 ± 6,25
15 dias	4,30 ± 3,29	4,85 ± 2,91*	6,30 ± 4,38

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2008)

Na exposição à concentração de 0,8 mg/l do Folicur® no tempo de exposição de cinco dias não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle em nenhuma das espécies. No tempo de exposição de dez dias todas as espécies mostraram diferença significativa em nível de  $p < 0,05$  e no tempo de exposição de 15 dias apenas a espécie *Cyprinus carpio* não mostrou diferença significativa. As espécies *Rhamdia quelen* e *Astyanax bimaculatus* neste tempo de exposição mostraram diferença significativas na ordem de  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente. Dados na Tabela 10 e Gráfico 5.

TABELA 10 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 mg/l

MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE MN E AMN			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	2,90 ± 1,59	2,65 ± 1,95	4,10 ± 2,22
5 dias	5,55 ± 4,26	3,65 ± 2,35	7,70 ± 4,93
10 dias	5,20 ± 3,19*	4,75 ± 4,44*	10,10 ± 8,30*
15 dias	4,70 ± 3,42	4,90 ± 2,47**	11,45 ± 9,99*

\* indica significante em nível de 5% (p<0,05); \*\* indica significante em nível de 1% (p<0,01)

FONTE: O autor (2008)

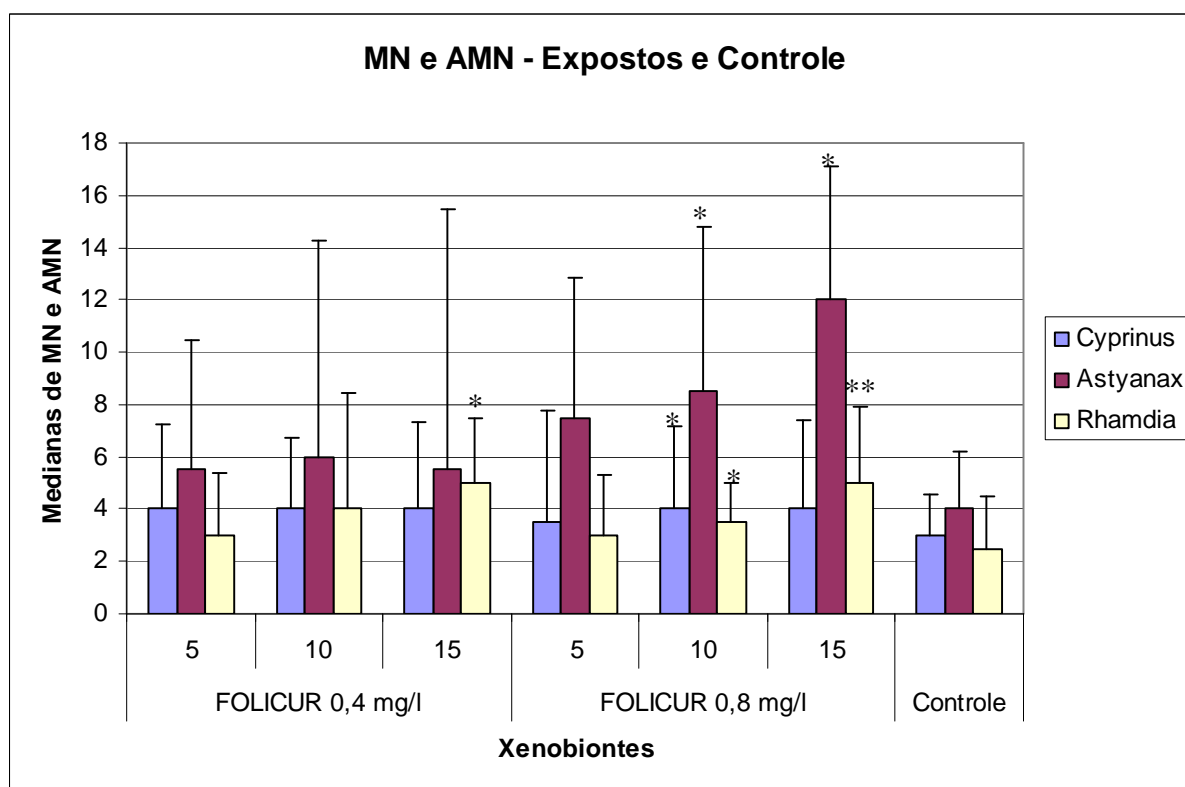


GRÁFICO 5 – MEDIANAS DOS MN E AMN RELATIVAS A EXPOSIÇÃO DE DUAS CONCENTRAÇÕES DE FOLICUR®

\* indica significante em nível de 5% (p<0,05); \*\* indica significante em nível de 1% (p<0,01)

FONTE: O autor (2008)

#### 4.2.3 Resultados da exposição ao Folicur® (0,8 mg/litro) e Roundup® (3,16 mg/l).

Na Tabela 11 e no Gráfico 6, os resultados mostram que todas as espécies analisadas foram sensíveis em nível estatisticamente muito significativo ( $p < 0,001$ ) nos tempos de exposição de dez e 15 dias. No entanto, no período de exposição de cinco dias, apenas a espécie *Cyprinus carpio* apresentou sensibilidade em nível muito significativo, as outras duas espécies não apresentaram diferenças em relação ao seu grupo controle.

TABELA 11 – MÉDIAS E DESVIOS DE MICRONÚCLEOS (MN) E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (AMN) DOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 mg/l e ao ROUNDUP® 3,16 mg/l.

	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE MN E AMN		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	2,90 ± 1,59	2,65 ± 1,95	4,10 ± 2,22
5 dias	5,05 ± 4,00	3,90 ± 2,43	6,35 ± 4,38
10 dias	6,60 ± 4,07**	6,00 ± 4,58**	10,27 ± 5,92**
15 dias	5,85 ± 4,37**	6,20 ± 4,76**	10,88 ± 7,97**

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )  
 FONTE: O autor (2008)

Com o uso destes biomarcadores, os dados obtidos apontam mais uma vez para uma ação conjunta dos dois produtos. Esta possível ação sinérgica parece ficar mais evidente quando comparados com os dados obtidos com a análise dos eritrócitos policromáticos mostrados anteriormente



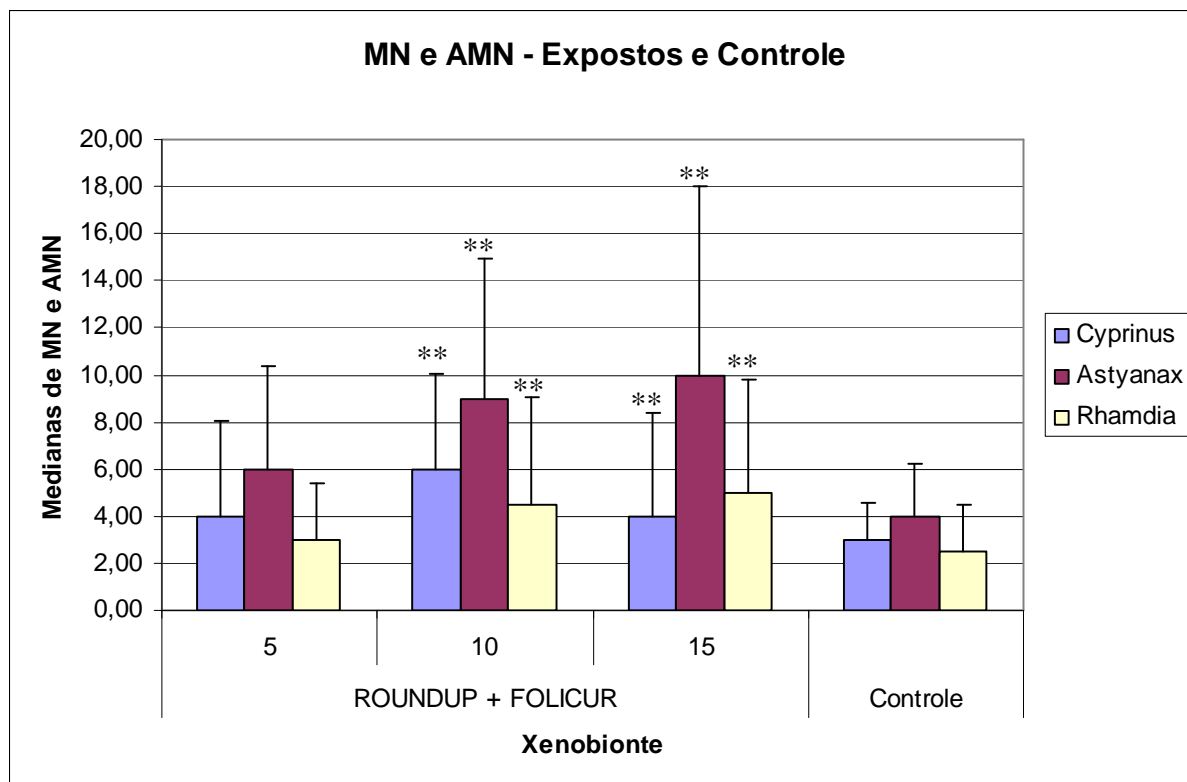


GRÁFICO 6 – MEDIANAS DOS MN E AMN RELATIVAS À EXPOSIÇÃO DA MISTURA DE FOLICUR® E ROUNDUP® EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO.

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )  
FONTE: O autor (2008)

### 4.3 RESULTADOS REFERENTES AO ENSAIO COMETA

#### 4.3.1 Resultados da exposição ao Roundup® (1,58 e 3,16 mg/l)

Com Ensaio Cometa realizado conforme descrito na metodologia foram obtidos resultados positivos, isto é, estatisticamente significante em quase todos os ensaios com o uso do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Para este teste foram usados os valores obtidos nos escores.

Os escores, nada mais são que um valor que indica o grau de dano observado nas análises dos cometas. O valor do escore pode variar de 0 a 400. Sendo 0 o valor que indica o menor grau de dano e 400 o grau máximo de dano.

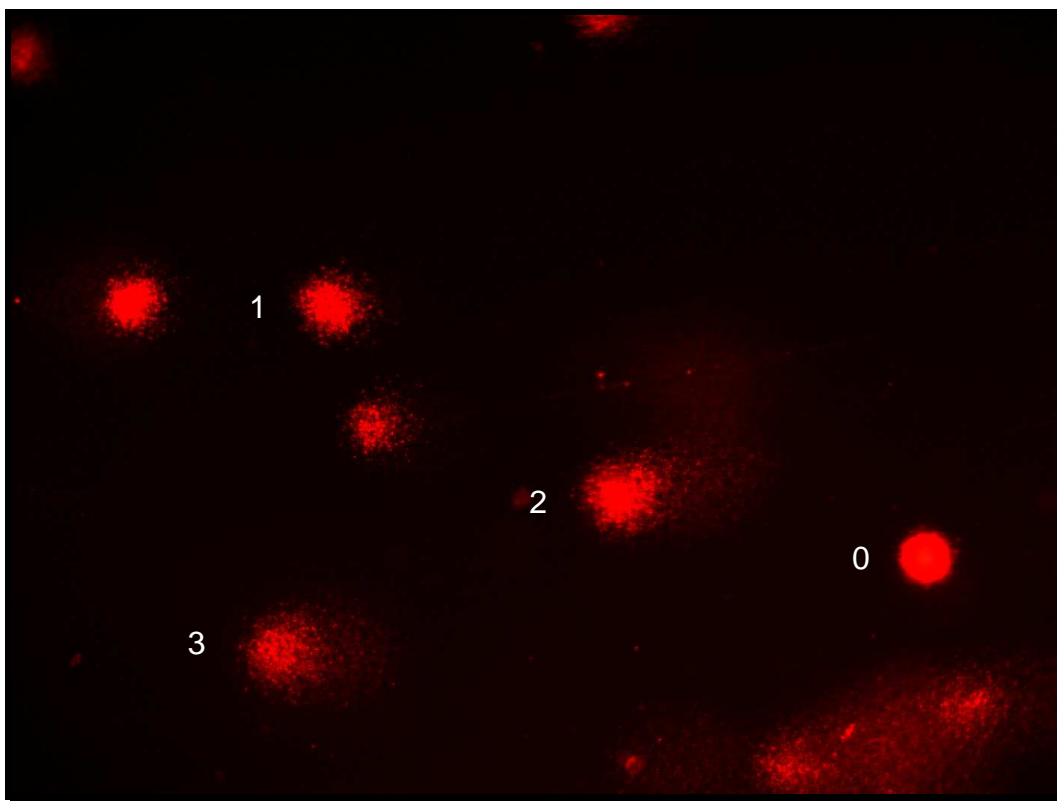


FIGURA 17 – COMETAS OBTIDOS DE SANGUE DE *Astyanax bimaculatus*. DIFERENTES CLASSES SÃO INDICADAS PELOS NÚMEROS NA FIGURA. (COLORAÇÃO BROMETO DE ETÍDEO – 1000X)

FONTE: O autor (2008)

Nas Tabelas 12 e 13 e no Gráfico 7 são mostrados os resultados de médias, medianas e desvio padrão obtidos com os escores dos animais expostos ao Roundup® nas concentrações padrões utilizadas em todos os bioensaios.

Na Tabela 12 se observa que o produto, mesmo na concentração mais baixa, foi capaz de ocasionar danos significativos em nível de DNA. Nos *Astyanax bimaculatus*, apesar de ocorrerem escores menores do que nas outras duas espécies, estes danos também foram significativos.

TABELA 12 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 1,58 mg/l.

MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bim.</i>
Controle	98,35 ± 18,14	94,05 ± 15,74	84,75 ± 2,20
5 dias	110,20 ± 13,49*	101,55 ± 10,79*	87,15 ± 3,86*
10 dias	110,45 ± 12,07*	104,15 ± 15,93*	87,11 ± 3,48*
15 dias	112,20 ± 14,19*	104,40 ± 14,53*	88,00 ± 6,68*

\* indica significante em nível de 5% (p<0,05);

FONTE: O autor (2008)

Os resultados mostrados na Tabela 13 e Gráfico 7 indicam que com a dosagem mais elevada do produto, ocorreram danos ao DNA em nível significativo ( $p < 0,05$ ) em todas as espécies no tempo de cinco dias de exposição.

No tempo de exposição de dez dias o nível de dano foi estatisticamente maior ( $p < 0,01$ ) na espécie *Astyanax bimaculatus* e nas espécies *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio* em nível significativo de  $p < 0,05$ . E no tempo de 15 dias de exposição as espécies *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus* mostraram um nível de significância de  $p < 0,01$  e *Rhamdia quelen* de  $p < 0,05$ .

TABELA 13 – MÉDIAS E DESVIOS DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO ROUNDUP® 3,16 mg/l

MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	98,35 ± 18,14	94,05 ± 15,74	84,75 ± 2,20
5 dias	112,80 ± 17,84*	104,35 ± 11,79*	89,80 ± 6,88*
10 dias	112,15 ± 15,78*	103,30 ± 14,64*	90,60 ± 6,60**
15 dias	114,45 ± 12,99**	106,10 ± 18,81*	89,70 ± 6,07**

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )

FONTE: O autor (2008)

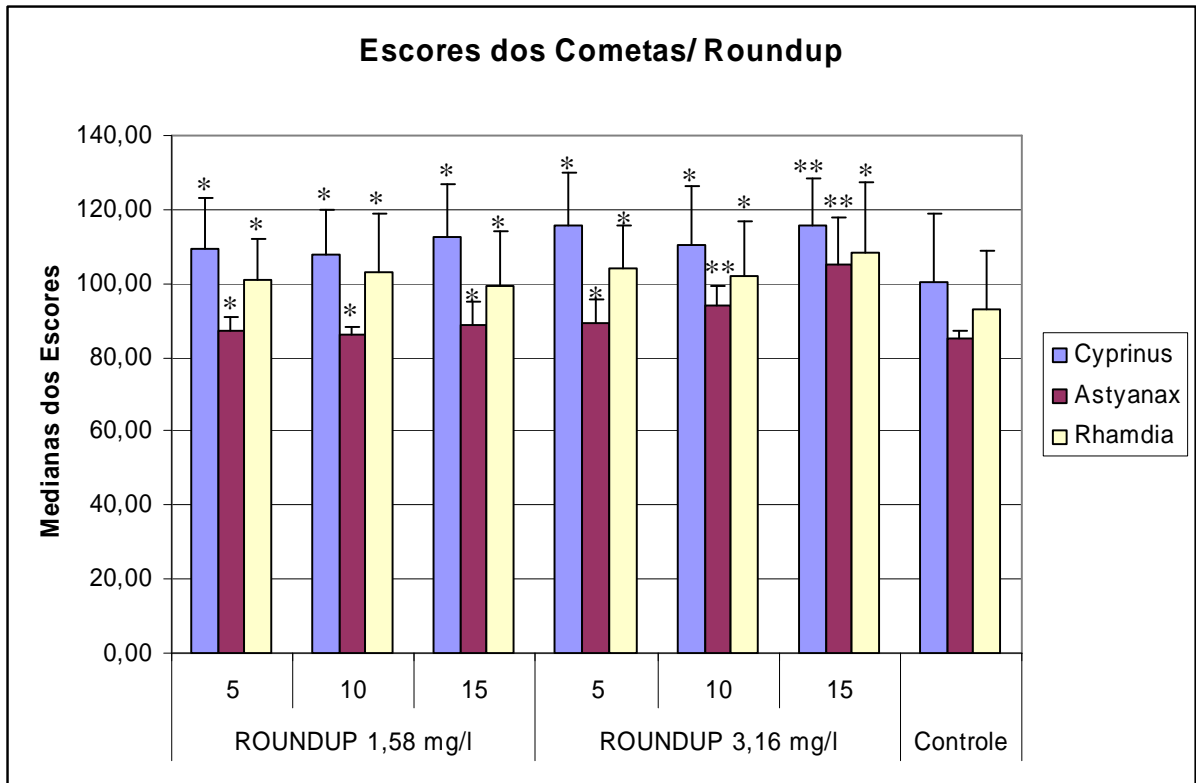


GRÁFICO 7 – MEDIANAS OBTIDAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA APÓS EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP®

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )n  
 FONTE: O autor (2008)

## 4.3.2 Resultados da exposição ao Folicur® (0,4 e 0,8 mg/l)

Na avaliação do Folicur®, pelo Ensaio do Cometa, os resultados mostrados nas Tabelas 14 e 15 indicam uma situação semelhante ao do Roundup®, pois mesmo na concentração mais baixa do produto apenas uma das espécies avaliadas (*Cyprinus carpio*) e somente no período de exposição de cinco dias, não apresentou diferença significativa em relação ao seu grupo controle. Nos demais períodos todas as espécies mostraram diferenças significativas.

TABELA 14 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,4 mg/l

	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	98,35 ± 18,14	94,05 ± 15,74	84,75 ± 2,20
5 dias	104,75 ± 9,54	102,90 ± 11,78*	89,15 ± 6,67*
10 dias	110,75 ± 10,48*	106,20 ± 18,21*	92,45 ± 11,91*
15 dias	110,85 ± 14,46*	106,00 ± 19,49*	97,10 ± 13,70*

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )

FONTE: O autor (2008)

Na concentração mais elevada do produto os danos ao DNA foram altamente significativos em relação aos grupos controles, notadamente no período de exposição de 15 dias e no de dez dias para as espécies *Rhamdia quelen* e *Astyanax bimaculatus*. Para este período a espécie *Cyprinus carpio* mostrou danos menos intensos ao seu DNA, mas de qualquer forma em nível estatisticamente significativo.

No período de exposição de cinco dias os danos foram significativos para todas as espécies.

TABELA 15 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 mg/l

MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS			
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	98,35 ± 18,14	94,05 ± 15,74	84,75 ± 2,20
5 dias	109,80 ± 20,38*	107,33 ± 19,97*	98,25 ± 21,12*
10 dias	112,40 ± 12,53*	114,55 ± 21,82*	94,85 ± 12,87**
15 dias	117,55 ± 13,99**	130,70 ± 10,04*	90,60 ± 8,34**

\* indica significante em nível de 5% (p<0,05); \*\* indica significante em nível de 1% (p<0,01)  
 FONTE: O autor (2008)

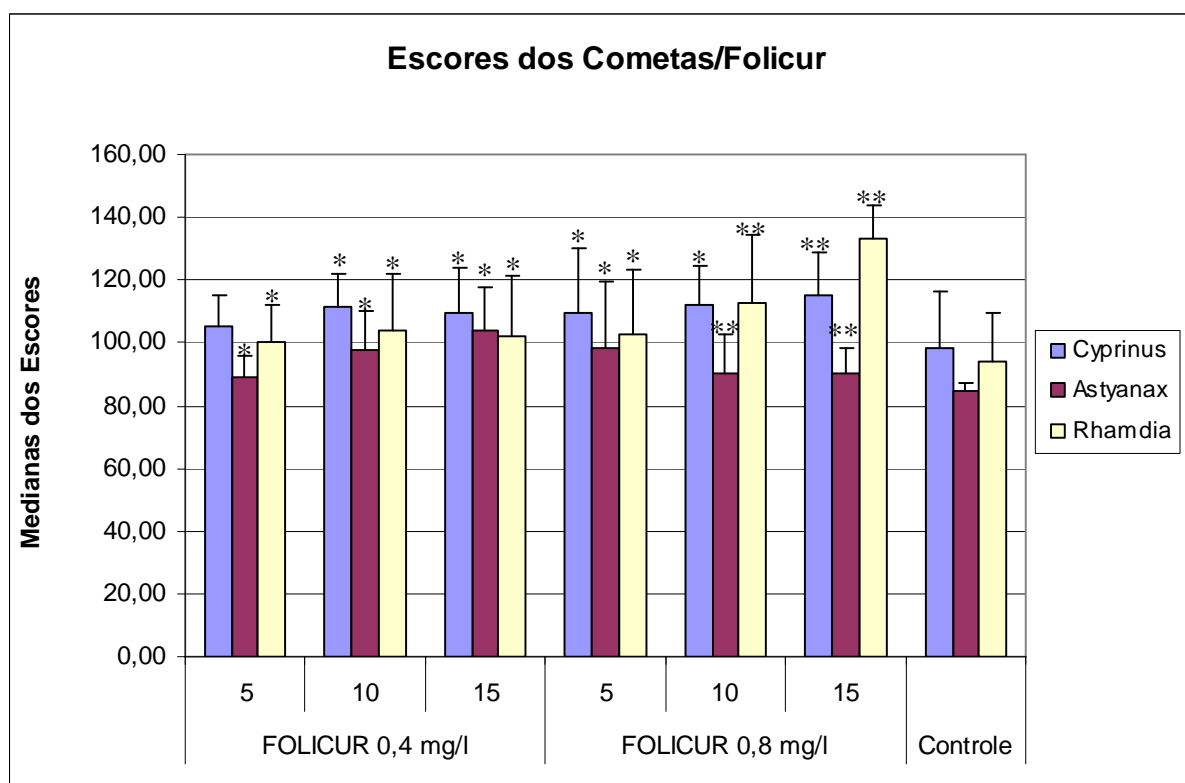


GRÁFICO 8 – MEDIANAS OBTIDAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA APÓS EXPOSIÇÃO AO FOLICUR®

\* indica significante em nível de 5% (p<0,05); \*\* indica significante em nível de 1% (p<0,01)  
 FONTE: O autor (2008)

#### 4.3.3 Resultados da exposição ao Folicur® (0,8 mg/l) e ao Roundup® (3,16mg/l)

Como resultado desta exposição, o nível de dano ao DNA foi muito mais elevado do que nas exposições isoladas ao produto. Na Tabela 16 e no Gráfico 9, os resultados obtidos mostram que os danos foram muito significativos ( $p < 0,01$ ) em todas as espécies no período de exposição de dez e 15 dias.

Para a exposição de cinco dias, apenas a espécie *Cyprinus carpio* apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) as outras duas se apresentaram como nos demais tempos de exposição.

TABELA 16 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS NOS BIOINDICADORES EXPOSTOS AO FOLICUR® 0,8 mg/l e ROUNDUP® 3,16 mg/l

	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS ESCORES DE COMETAS		
	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>
Controle	98,35 ± 18,14	94,05 ± 15,74	84,75 ± 2,20
5 dias	113,00 ± 17,49*	114,75 ± 3,89**	94,90 ± 12,66**
10 dias	125,90 ± 8,01**	139,90 ± 7,46**	98,73 ± 15,15**
15 dias	128,45 ± 19,84**	140,70 ± 7,78 **	96,41 ± 12,84**

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )

FONTE: O autor (2008)



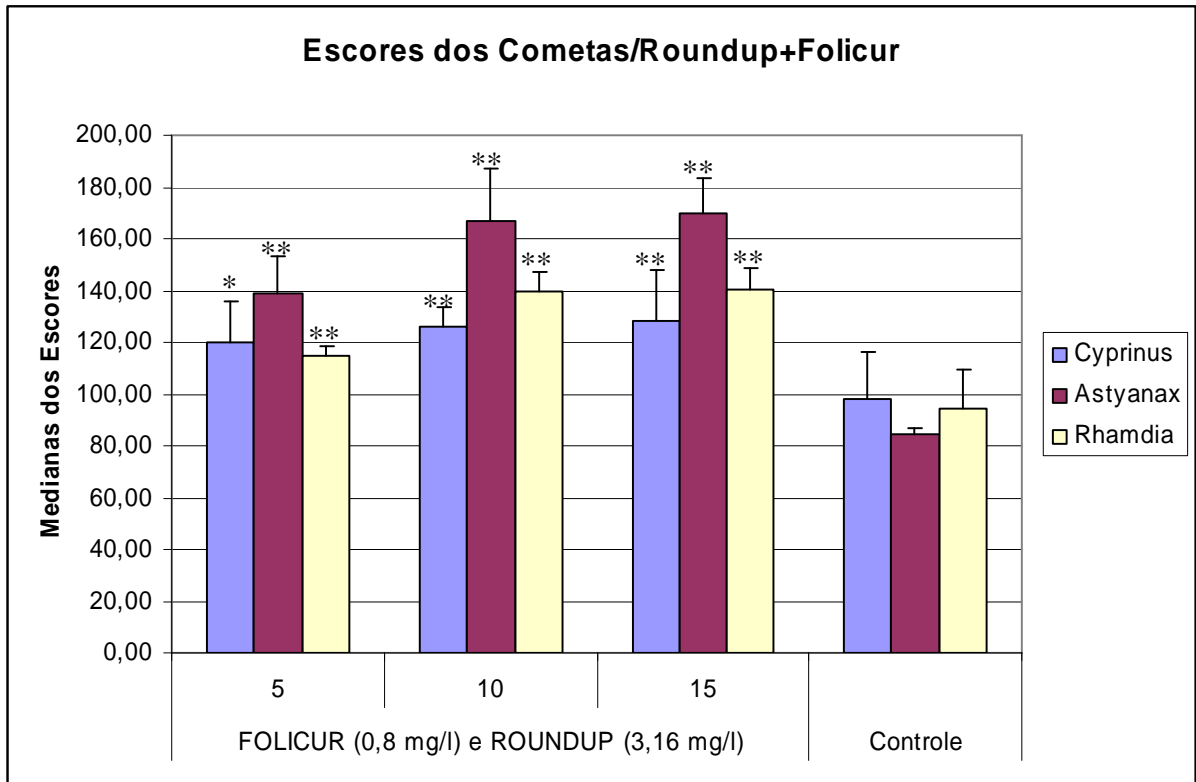


GRÁFICO 9 – MEDIANAS OBTIDAS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA APÓS EXPOSIÇÃO AO ROUNDUP® E FOLICUR®

\* indica significante em nível de 5% ( $p < 0,05$ ); \*\* indica significante em nível de 1% ( $p < 0,01$ )

FONTE: O autor (2008)

#### 4.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A menor concentração utilizada de Roundup® (1,58 mg/l) é aproximadamente três vezes superior à admitida pelas normas brasileiras de potabilidade (500 µg/litro) expressas na Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde e aproximadamente 1,5 vezes maior do que a admitida pela Organização Mundial de Saúde (1,0 mg/l). Mas, estes valores são para o princípio ativo e não para o produto vendido comercialmente.

Quanto ao Folicur®, cujo princípio ativo é tebuconazole, não existem normas para a sua presença na água. Nem do princípio ativo nem do produto comercial. Os limites que existem são em referência a produtos originados por sua decomposição como os triazóis.

As concentrações utilizadas nos bioensaios foram determinadas por ensaios em lotes de 6 animais expostos ao produto por período de 30 dias.

Com a concentração máxima (0,8 mg/l) os testes mostraram que as espécies poderiam sobreviver sem problemas pelo período máximo dos bioensaios. Dosagens de 1,6 mg/l já ocasionavam problemas na movimentação em alguns animais após exposição de 96 h e após cinco dias, a morte de alguns animais.

A partir das informações disponíveis para ambos os produtos, se levanta a hipótese de uma ação sinérgica dos compostos. Isto, baseado na possibilidade do encontro destas substâncias no meio aquático.

Este encontro ocorre com maior frequência em pequenas propriedades rurais, onde é comumente incentivada a criação de peixes, em consórcio com plantações, como complemento de renda familiar.

Quando não em consórcio, estes tanques de criação, são próximos de plantações onde os dois produtos são aplicados ou ainda podem alcançar os tanques por carreamento pelas águas das chuvas.

As análises realizadas permitem o acompanhamento da ação dos produtos isoladamente e em conjunto. Com a finalidade de facilitar a análise, os resultados obtidos e apresentados anteriormente estão resumidos no Quadro 2 a seguir:

QUADRO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES BIOENSAIOS ENTRE AS ESPÉCIES

	Roundup® 1,58 mg/l			Roundup® 3,16 mg/l			Folicur® 0,4 mg/l			Folicur® 0,8 mg/l			Folicur® + Roundup®			
	05	10	15	05	10	15	05	10	15	05	10	15	05	10	15	
Rhamdia	-	-	*	*	*	**	-	-	*	-	*	*	*	*	**	Poli
Astyanax	-	-	*	*	**	*	-	-	*	*	*	*	*	**	*	
Cyprinus	-	-	-	*	*	*	-	-	-	-	-	*	*	*	*	
Rhamdia	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	*	**	-	**	**	MN
Astyanax	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	**	**	
Cyprinus	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	*	-	-	**	**	
Rhamdia	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	**	**	**	**	**	EC
Astyanax	*	*	*	*	**	**	*	*	*	*	**	**	**	**	**	
Cyprinus	*	*	*	*	*	**	-	*	*	*	*	**	*	**	**	

Poli- Eritrócitos Policromáticos; MN – Micronúcleos e Alterações Morfológicas Nucleares; EC – Ensaio Cometa; – não significativo; \* significativo em nível de 5% (p<0,05); \*\* significativo em nível de 1% (p<0,01).

Estas diferenças de respostas encontradas quando da exposição aos produtos testados podem estar ligadas a diferentes causas. Uma delas pode ser devida às diferentes taxas metabólicas que existem entre as espécies.

Outro fator importante a ser considerado é o de que, ao ser padronizada uma faixa de temperatura para a realização do experimento, esta pode não ser a ideal para uma determinada espécie sob avaliação.

Como uma das espécies avaliadas (*Cyprinus carpio*) não é nativa da América do Sul e foi introduzida, com sucesso, em várias regiões do mundo, espera-se que sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes seja muito boa.

Em outras palavras, sua flexibilidade em se adaptar, esta justamente na capacidade de rapidamente ajustar seu metabolismo a diferentes situações ambientais (GUSTAVINO *et al.*, 2001; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002; GRISOLIA, C. K. 2005).

Das espécies avaliadas *Astyanax bimaculatus* e *Rhamdia quelen* foram as que mostraram respostas estatisticamente mais significativas em relação aos seus grupos controle nos bioensaios.

No entanto, dentre elas, *Astyanax bimaculatus*, foi a única que apresentou morte de exemplares no transcurso dos bioensaios. Além de ser uma espécie de difícil retirada de sangue pela veia caudal, pelo seu tamanho, o que dificulta um eventual ensaio crônico, onde este procedimento possa ser necessário.

Outro fator a ser considerado com esta espécie é relativo ao processo de anestesia e recuperação desta espécie. Ela se mostrou mais problemática do que nas outras espécies. Para esta, mesmo com concentrações do anestésico muito inferiores a 1%, e que permitiam um processo de anestesia lento (mais de 2 minutos), a recuperação posterior nem sempre era possível.

Para as outras duas espécies, o tempo de anestesia com benzocaína a 1,5%, leva em torno de um a dois minutos. Após 3 minutos fora da água, os exemplares podem ser devolvidos aos aquários e sua recuperação total se dá em torno de oito minutos.

Da análise dos eritrócitos policromáticos circulantes, nota-se que para o Roundup® na concentração de 1,58 mg/l, só houve diferença significativa nas duas espécies nativas que foram expostas ao produto por 15 dias enquanto que *Cyprinus carpio* não se mostrou sensível a esta concentração com este biomarcador.

Quando a dosagem passou para 3,16 mg/l, todas as espécies avaliadas mostraram que de alguma maneira, ocorreu uma diminuição do número de eritrócitos policromáticos presentes na circulação em todos os tempos de exposição.

Estes resultados indicam que o produto, em concentrações maiores, age sobre os tecidos hematopoiéticos (rim anterior e posterior, fígado entre outros) dos peixes afetando a capacidades na formação dos eritrócitos ou eliminando os eritrócitos policromáticos.

No entanto, seria enganoso pensar que em concentrações menores não ocorrem danos. O Ensaio Cometa indica que mesmo na menor concentração testada, todas as espécies mostraram danos ao DNA e a partir do menor período de exposição.

Mesmo que os danos causados ao DNA sejam passíveis de reparo, pois como explicado anteriormente, o Ensaio Cometa é um “retrato” da célula em um dado momento, vemos que em todos os períodos e concentrações utilizados nos bioensaios, ocorreram danos no DNA de maneira significativa. Desta forma é plausível se pensar que eventuais danos podem não ser reparados e desta forma, trazer algum prejuízo às células e ao indivíduo.

Os resultados obtidos com a contagem de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares indicaram que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos expostos e os seus controles. Com exceção de *Cyprinus carpio* no período de exposição de cinco dias na concentração de 3,16 mg/l de Roundup®.

Embora a origem dos micronúcleos, seja bem conhecida, a padronização deste ensaio esta muito bem estabelecida em linhagens de camundongos e sua utilização em peixes é o resultado de uma adaptação deste protocolo de mamíferos.

Assim como em mamíferos, nos peixes, o aparecimento dos micronúcleos é dependente da ação de produtos clastogênicos ou aneugênicos.

Embora às alterações morfológicas nucleares, quanto a sua origem, ainda não estejam completamente esclarecidas, vários trabalhos dão suporte à hipótese de que esta se deva a eventos genotóxicos.

No trabalho de Guilherme *et al.* (2008) foi evidenciada a correlação entre a presença destas alterações e efeitos genotóxicos. Peixes da espécie *Liza aurata* coletados no verão e no inverno em águas contaminadas com mercúrio mostraram diferenças nestas frequências. Quando coletados no verão apresentavam frequência alta de eritrócitos policromáticos e número de alterações morfológicas nucleares elevado. No inverno, o número de eritrócitos policromáticos decaiu e também o número destas alterações. Sugerem os autores que no inverno a atividade hematopoiética seria reduzida e ocorreria uma diminuição no número de eritrócitos com as alterações morfológicas nucleares.

Os resultados destes bioensaios e de outros trabalhos realizados neste laboratório (e.g. FERRARO, *et al.*, 2004; RAMSDORF, 2007), indicam também que sua origem se deva a eventos genotóxicos e se mostram potencialmente úteis em estudos de monitoramento ambiental.

Pelos resultados obtidos, o Roundup® parece não exercer papel aneugênico ou clastogênico sobre os eritrócitos nas concentrações e períodos de exposição testados.

No entanto, seu papel de agente citotóxico parece ser evidenciado quando analisada a relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, pelo menos quando da utilização de concentrações mais elevadas em todas as espécies testadas e particularmente nas espécies nativas quando o período de exposição em menores concentrações ficou superior a dez dias.

O papel citotóxico encontrado nestes ensaios corrobora os encontrados nos trabalhos de Dallegrave *et al.* (2003), obtidos na exposição de ratos ao produto, onde também foi evidenciada atuação citotóxica do produto e de Gluszczak, *et al.*

(2006 e 2007) onde foram constatadas alterações em parâmetros metabólicos e enzimáticos em células de piava (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*).

Além deste papel citotóxico, também fica evidenciado seu envolvimento na origem de danos ao DNA, constatado pelo Ensaio Cometa. Estes resultados corroboram os encontrados por Marc, *et al.* (2004) onde foi constatada interferência no ciclo celular de células embrionárias do ouriço do mar.

Os dados nos permitem ainda inferir que embora as concentrações utilizadas, sejam superiores àquelas permitidas na água para consumo humano por normas nacionais e internacionais, estes limites “seguros” para o consumo humano, não deixa de causar preocupação o fato de que, pelo menos na menor concentração utilizada e apenas  $\pm 50\%$  maior do que as normas internacionais, os ensaios já mostram uma diminuição na atividade dos tecidos hematopoiéticos nos peixes sob condições de exposição aguda.

Os resultados obtidos são ainda mais preocupantes quando se pensa em nível de populações naturais expostas a este produto com persistência superior a 100 dias no ambiente.

Os animais expostos ao Folicur® nas dosagens de 0,4 mg/l e 0,8 mg/l apresentaram variações no número de eritrócitos policromáticos circulantes.

Todas as espécies apresentaram sensibilidade ao Folicur® na concentração de 0,4 mg/l. Estes resultados coincidem com os achados por LANGIANO e MARTINEZ, (2008) utilizando-se da espécie *Prochilodus lineatus* quanto à sensibilidade das espécies na avaliação de biomarcadores.

Na exposição à dosagem de 0,8 mg/l de Folicur® todas as espécies apresentaram diminuição no número de eritrócitos policromáticos. Enquanto que *Astyanax bimaculatus* respondeu depois de cinco dias de exposição, *Rhamdia quelen* respondeu após dez dias e finalmente *Cyprinus carpio* apenas após 15 dias.

Quando utilizado os biomarcadores micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, a concentração de 0,8 mg/l se mostra mais danosa após cinco dias de

exposição. Nos tempos de dez e 15 dias de exposição é significativa a diferença de alterações nas espécies avaliadas.

Na utilização do Ensaio Cometa, somente *Cyprinus carpio*, na dosagem de 0,4 mg/l e na exposição de 5 dias não apresentou danos significativos no DNA. Todos os outros grupos mostraram diferenças significativas e muito significativas.

Desta forma também fica caracterizado o potencial genotóxico do Folicur® nas espécies utilizadas. Além do que o Folicur® também induziu aumento no número de alterações morfológicas nucleares.

Ou seu efeito é acumulativo, pois estas alterações morfológicas nucleares apareceram somente após certo período de tempo (10 dias) e na concentração de 0,8 mg/l. Desta forma então, o produto pode estar agindo diretamente nas células circulantes ou nos eritrócitos em formação e de alguma forma provocar as alterações visualizadas.

Ou seu efeito se dá sobre as células sanguíneas em formação. Como estas devem levar um determinado período tempo até chegarem à circulação, este seria o motivo pelo qual, somente depois de certo tempo de exposição se percebem seus efeitos com a utilização do biomarcador alterações morfológicas nucleares e micronúcleos.

Todos os resultados obtidos com estes biomarcadores levam a inferir que os produtos analisados podem agir sinergicamente sobre as espécies avaliadas, causando danos tanto em nível citotóxico quanto em nível genotóxico.

Como ambos os produtos agem isoladamente causando danos ao DNA, como visto nos resultados, sua ação sinérgica sobre o material genético é um fator de risco sobre a integridade genômica de populações expostas a estes produtos concomitantemente.

Estas instabilidades no DNA podem levar a uma perda de variabilidade ao longo do tempo, comprometendo a capacidade de sobrevivência da população exposta a estas substâncias. Em nível individual os organismos podem ficar



suscetíveis ao desenvolvimento de tumores ou outras doenças conforme o postulado pelos trabalhos de Padrangí, *et al.* (1995), MARONI, *et al.* (2000) e Grisólia, (2005).

#### 4.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES NOS DIFERENTES BIOENSAIOS

Ao serem analisados os resultados dos diferentes bioensaios, são notadas variações nas respostas dadas pelas diferentes espécies após a exposição aos contaminantes. Estas comparações entre os diferentes biomarcadores podem auxiliar na escolha de qual dos animais testados (bioindicador) é mais sensível a um determinado biomarcador.

O ensaio onde é utilizada a frequência de eritrócitos policromáticos em relação ao normocromáticos, percebe-se de maneira direta a ação citotóxica de um determinado composto pela queda no número dos primeiros em relação aos segundos. Não querendo, no entanto dizer que a ação citotóxica do composto estudado não o seja justamente por sua capacidade genotóxica. Mas, o ensaio *per si* não pode demonstrar esta ocorrência.

Nestas análises, foram comparadas as três espécies entre si quanto ao tempo de exposição e contaminante utilizado. As comparações foram realizadas utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Estas comparações estão representadas no Gráfico 10, onde fica evidenciado que quando da utilização do biomarcador eritrócitos policromáticos a espécie *Rhamdia quelen*, mostrou-se mais sensível, pois teve uma diminuição mais acentuada no número de eritrócitos do que as outras duas espécies avaliadas no período de exposição de 15 dias ao Roundup® na concentração de 1,58 mg/l.

Esta mesma sensibilidade é demonstrada na exposição ao Folicur® na concentração de 0,4 mg/l, período de exposição de 15 dias e também quando da exposição à mistura dos dois produtos nos períodos de cinco e quinze dias.

Embora a espécie não tenha demonstrado este mesmo grau de sensibilidade nas concentrações maiores dos produtos, estas variações podem ser atribuídas a variações individuais, uma vez que pelo próprio desenho do experimento, são lotes diferentes de animais que são expostos aos contaminantes em épocas diferentes.

Embora, na maioria dos diferentes períodos e contaminantes utilizados *Rhamdia quelen* tenha demonstrado uma tendência a diminuir com mais intensidade

o número de policromáticos em relação às outras, nem sempre estas diferenças tem se revelado estatisticamente significantes.

As outras duas espécies não apresentaram diferença significativa no uso do biomarcador eritrócitos policromáticos, com os *Astyanax bimaculatus* tendendo a mostrar uma maior frequência de policromáticos do que *Cyprinus carpio*.

Desta forma, com o uso do biomarcador eritrócitos policromáticos e para estes contaminantes, a espécie *Rhamdia quelen*, mostra-se como um bom bioindicador, além de ser uma espécie nativa e que pode ser facilmente obtida e mantida em aquários.

Seria importante que se fizessem exposições crônicas aos produtos avaliados, com coletas periódicas de sangue desta espécie para uma avaliação mais apurada do seu comportamento em relação a este biomarcador.

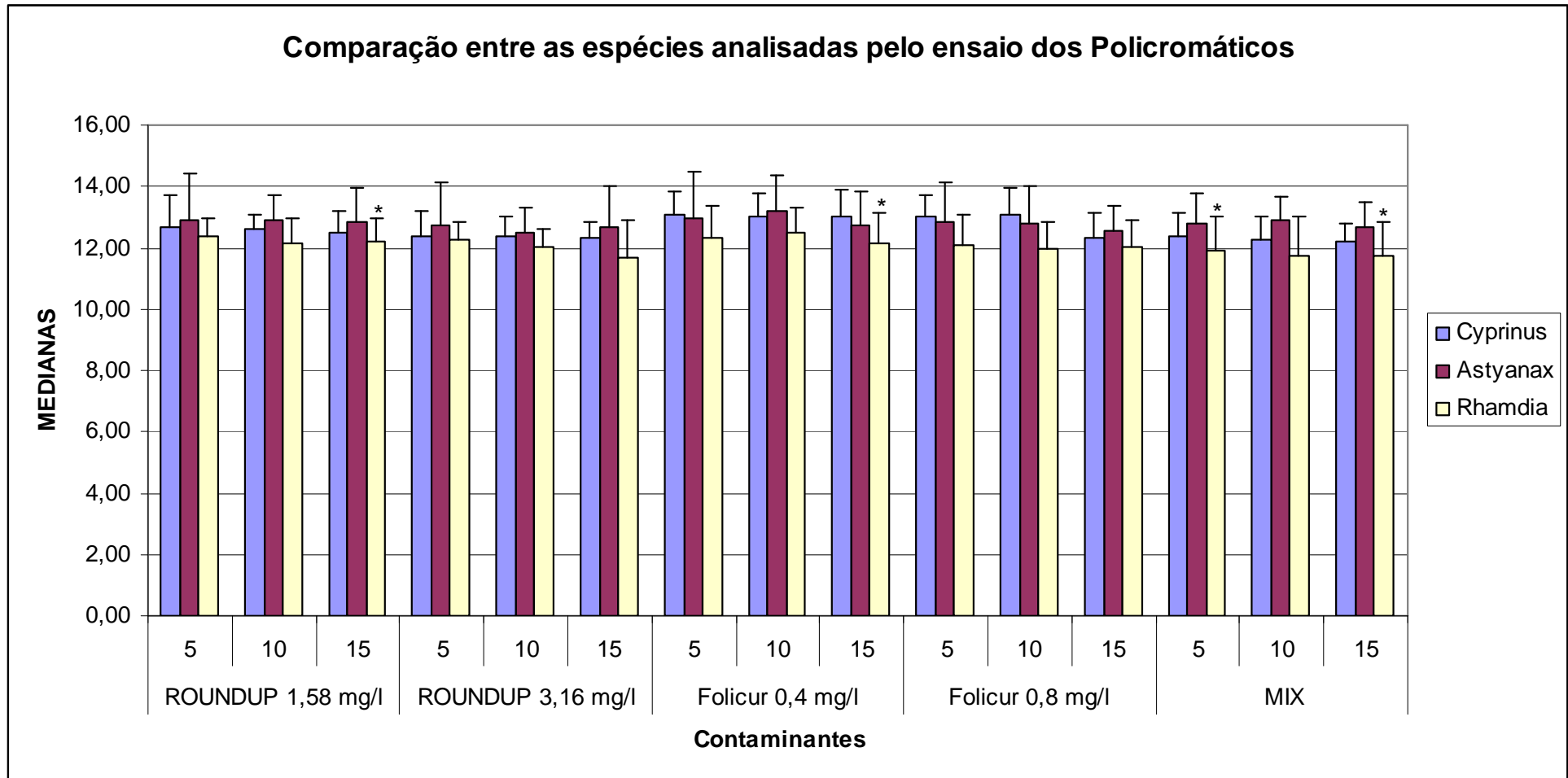


GRÁFICO 10 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES EXPOSTAS AOS CONTAMINANTES E ANALISADAS PELO PERCENTUAL DE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS. A COMPARAÇÃO FOI REALIZADA ENTRE AS TRES ESPÉCIES EXPOSTAS PELO MESMO PERÍODO AO MESMO CONTAMINANTE

\* INDICA DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P<0,05; MANN –WHITNEY)

FONTE: O autor (2008)

No uso específico do biomarcador micronúcleos e alterações morfológicas nucleares um menor número de alterações ou micronúcleos pode nos indicar uma menor sensibilidade das espécies utilizadas aos produtos a que foram expostas.

Os dados apresentados no Gráfico 11 indicam que as três espécies responderam com alterações morfológicas nucleares e micronúcleos na exposição ao xenobiontes.

Com o uso deste biomarcador, embora não com diferença significativa, a espécie *Astyanax bimaculatus* mostra um maior número de alterações do que as outras duas. Em hipótese, isto poderia indicar que esta espécie possa estar repondo células sanguíneas de uma forma mais rápida. Esta hipótese pode encontrar apoio quando se analisam as freqüências de eritrócitos policromáticos desta espécie (Gráfico 10). Verifica-se um maior índice deste tipo de célula em quase todos os ensaios; indicando que, novos eritrócitos normais e com alterações morfológicas nucleares estão entrando na circulação sanguínea.

Mas também não deve ser descartada a hipótese de que, estas diferenças, sejam apenas o resultado de uma atividade metabólica mais intensa.

A análise estatística foi realizada com o teste Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

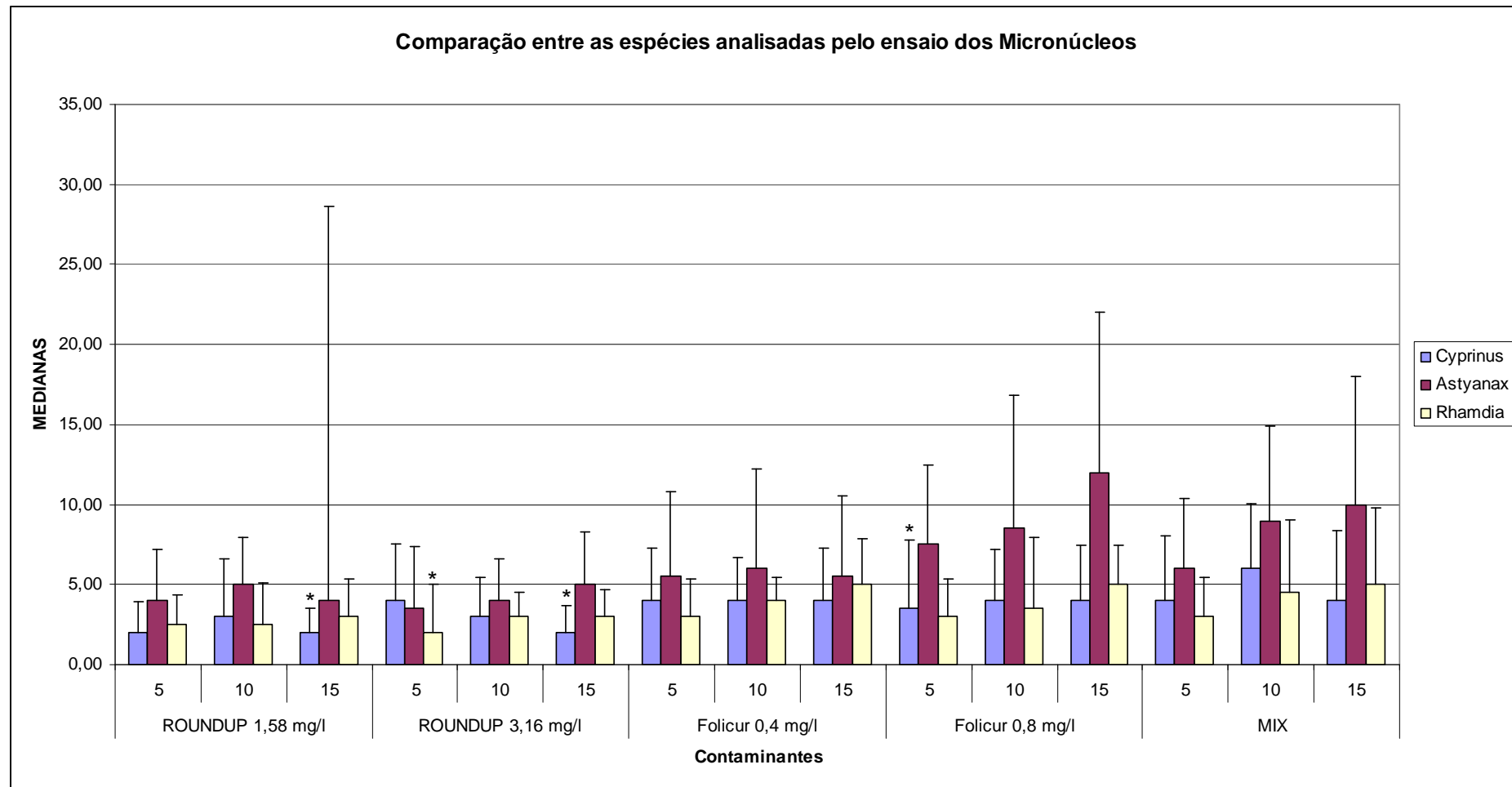


GRÁFICO 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES EXPOSTAS AOS CONTAMINANTES E ANALISADAS PELO NÚMERO DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES. A COMPARAÇÃO FOI REALIZADA ENTRE AS TRES ESPÉCIES EXPOSTAS PELO MESMO PERÍODO AO MESMO CONTAMINANTE

\* INDICA DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P<0,05; MANN –WHITNEY)

FONTE: O autor (2008)

Na comparação do Ensaio Cometa, nenhuma das análises realizadas mostrou qualquer semelhança em nível de mediana de escores entre as três espécies, sendo utilizado o teste estatístico Mann-Whitney com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para as comparações.

Todas as análises indicam que, mesmo quando se comparam apenas duas espécies entre si, existe diferença estatisticamente significativa entre elas. Em outras palavras, os escores obtidos com o Ensaio Cometa são diferentes entre as espécies.

Disto resulta que a comparação entre as espécies para saber se alguma delas respondeu de maneira mais eficiente fica comprometida, pois, todas as comparações com seus respectivos controles responderam de maneira estatisticamente significativa nos bioensaios.

Da análise estatística mostrada no Gráfico 12, constata-se que a espécie *Astyanax bimaculatus* apresentou em todos os ensaios, o menor índice de dano. Enquanto *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio* apresentam índices variáveis (mais baixos ou mais altos) entre si, de acordo com o período de exposição e agente contaminante.

Pode-se apenas especular quanto à razão destas diferenças, mas, como o Ensaio Cometa mede o dano direto ao DNA, e sobre este atuam os mecanismos de reparo, é possível que as diferenças estejam justamente ligadas a eles. Ou ainda, conforme Dhawan, Bajpayer e Parmar (2008), a sensibilidade do Ensaio Cometa pode ser afetada por variações individuais.

Pode-se também notar que existe uma tendência de que à medida que as concentrações dos compostos nos bioensaios aumentam os danos ao DNA também aumentam, notadamente com os dois compostos agindo em conjunto.

Estes resultados por sua vez, apontam de maneira direta a eficiência e precisão do Ensaio Cometa em quantificar danos ao DNA. No entanto, sua aplicação em ensaios de biomonitoramento ambiental, fica condicionada a uma padronização do ensaio ao bioindicador utilizado.

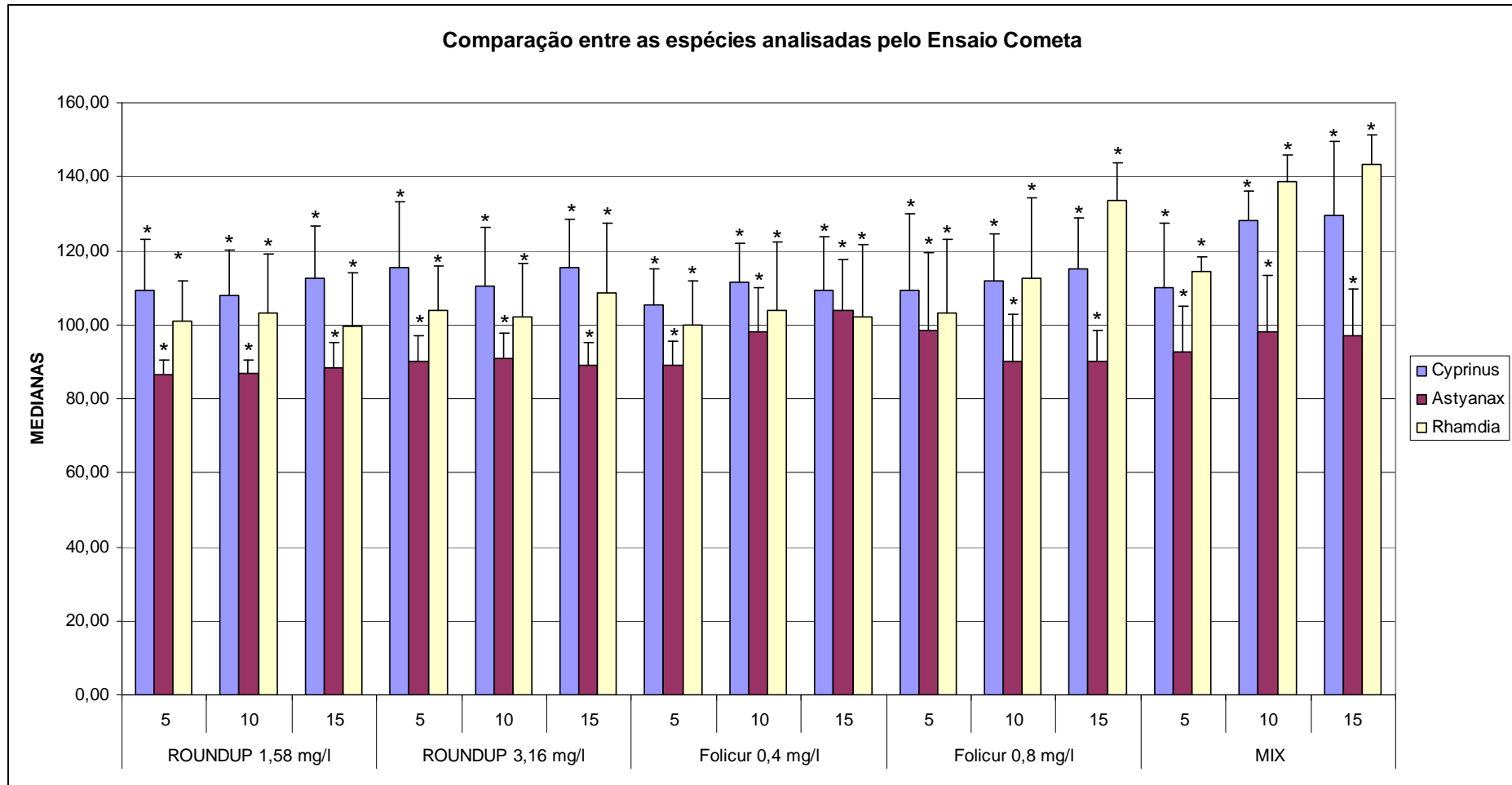


GRÁFICO 12 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES EXPOSTAS AOS CONTAMINANTES E ANALISADAS PELOS ENSAIO COMETA. A COMPARAÇÃO FOI REALIZADA ENTRE AS TRÊS ESPÉCIES EXPOSTAS PELO MESMO PERÍODO AO MESMO CONTAMINANTE

\* INDICA DIFERENÇA ESTATÍSTICA (P<0,05; MANN -WHITNEY)

FONTE: O autor (2008)



## 5 CONCLUSÕES

- ⊕ As três espécies *Rhamdia quelen*, *Astyanax bimaculatus* e *Cyprinus carpio* possuem potencial para serem bioindicadores, notadamente quando utilizado como biomarcador o Ensaio Cometa.
- ⊕ As três espécies *Rhamdia quelen*, *Astyanax bimaculatus* e *Cyprinus carpio* se mostraram sensíveis quando utilizado o Teste do Micronúcleo Písceo em conjunto com as Alterações Morfológicas Nucleares (AMN).
- ⊕ A ausência ou baixa frequência de micronúcleos clássicos não deve significar necessariamente ausência de efeito genotóxico de uma determinada substância, mas provavelmente é devida ao nosso desconhecimento dos processos de formação destas estruturas em peixes.
- ⊕ Pelos resultados obtidos no presente trabalho as alterações morfológicas nucleares dos eritrócitos circulantes podem ser consideradas manifestações dos efeitos genotóxicos de xenobiontes em peixes.
- ⊕ Foi evidenciada a importância da análise dos eritrócitos normocromáticos e policromáticos nos ensaios de biomonitoramento utilizando-se do sangue dos peixes.
- ⊕ Foi demonstrado o potencial genotóxico do Folicur® e do Roundup® Original em todas as espécies expostas a estes produtos. No entanto seus mecanismos de atuação sobre o DNA são desconhecidos.

- ⊕ Ficou evidenciado o potencial citotóxico através do ensaio dos eritrócitos policromáticos do Roundup® Original e do Folicur® dependendo de sua concentração em ensaios agudos sobre as três espécies de peixes avaliadas.
  
- ⊕ Foi demonstrada também a ação sinérgica do Roundup® Original e do Folicur® nas espécies avaliadas quando presentes ao mesmo tempo na água.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLAH, G. A. *et al.* (1999). A comparative evaluation of aflatoxin B<sub>1</sub> genotoxicity in fish models using the comet assay. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 446, p. 181 – 188.

ALBERTINI, R. J. *et al.* (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, p. 111-172.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research – Genetic Toxicology**, v. 343, p. 121-135.

ARKHIPCHUK, V. V., GARANKO, N. N. (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 42-52.

AYLLON, F.; GARCIA – VAZQUEZ, E. (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 467, p. 177-86.

BETTI, C. *et al.* (1995). Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, p. 201-207.

BOLOGNESI, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 543, p. 251-257.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Sci.**, Ottawa, v. 47, p. 2123-2136.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L. (1997). The fish fauna from a small forest stream of the Upper Parana River Basin, southern Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwat.**, v. 7, p. 337-352.

ÇAVAS, T., GÖZÜKARA, S. E. (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538 p. 81-91.

ÇAVAS, T., GÖZÜKARA, S. E. (2005a) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271

ÇAVAS, T., GÖZÜKARA, S. E. (2005b). Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 107-111.

- CERICATO, L. *et al.* (2008). Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, *In Press, Corrected Proof*, Available online 15 September 2008
- CESTARI, M. M. *et al.* (2004). Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, 2 p. 270-274.
- CHEMICAL ABSTRACT SERVICE**. Disponível em: (<http://www.cas.org/cgi/cas/regreport.pl>) acesso em: 21 de novembro de 2008.
- COLE, D. J. (1985). Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. Londres p. 49 - 54.
- COLLINS, A. R.; AI – GUO, M.; DUTHIE, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research – DNA Repair**, Amsterdam, v. 336, p. 69-77.
- COLLINS, A. R. *et al.* (1997). The comet assay: what can it really tell us?. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p. 183-193.
- COLLINS, A. R. *et al.* (2008). The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, 3, p. 143-151.
- COSTA, C. *et al.* (2007). Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: Preliminary survey. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 415-418.
- CURI, P. R. (1998). **Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas**. 2ª ed., Botucatu, Tipomic.
- D'ARCE, L.P.G., SYLLOS COLUS, I.M. de (2000). Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide in Brazil. **Teratogen. Carcinogen. Mutagen**, v. 20, p. 161-170
- DALLEGRAVE, E. *et al.* (2003). The teratogenic potential of the herbicide glyphosate – Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters**, vol. 142, p. 45-52.
- DHAWAN, A., BAJPAYEE, M., PARMAR, D. (2008). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA in different models. **Cell Biology Toxicology**. In press. DOI 10.1007/s10565-008-9072-z
- Da SILVA SOUZA, T., FONTANETTI, C.S. (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**. v. 605(1-2), p. 87-93.

DE ZWART, D. (1995). Monitoring water quality in the future, vol 3: Biomonitoring. National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, The Netherlands.

DUTHIE, S. J. *et al.* (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 393, p. 223-231.

EDDLESTON, M. *et al.* (2002). Pesticide poisoning in the developing world, a minimum pesticides list. **Lancet**, v. 360, p. 1163-167.

ERGENE, S. *et al.* (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 385-391.

ESPINA, N. G.; WEISS, P. (1995). DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, Kidlington, v. 39 p. 309-12.

FAÇANHA, M. F., GOMES, L. C. (2005). A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, v. 35, p. 71-75.

FENECH, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95.

FERRARI, I. (1991). Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. R.; Monteleone-Neto, R. **Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética. p. 107-122.

FERRARO, M. V. M. *et al.* (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetic and Molecular Biology**, v. 27,1, p. 103-107.

FRENZILLI, G. *et al.* (1997). Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single gell electrophoresis. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v.375, p. 117-123.

FRENZILI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. (2008). The Comet Assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**. Article in press (MUTREV-7886), 13p.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. (2005). Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Ed. ACADCOM disponível em <http://www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/indice.asp>. Acesso em julho 2008.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. (2001). Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, p. 153-162

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. (2002). Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by Chromosomal aberration analysis micronucleus assay and comet assay. **J. Appl. Toxicol.**, v. 22, p. 249-255.

GLUSCZAK, L. *et al.* (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 65, 237–241.

GLUSCZAK, L. *et al.* (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 146, p. 519-524.

GOKSOYR, A. *et al.* (1991). Immunochemical cross-reactivity of  $\beta$ -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in Liver Microsomes from Different Fish Species and Rat. **Fish Physiology**. v. 9, p. 1-13.

GOMES, L. C. *et al.* (2001). Efficacy of Benzocaine as an Anesthetic in Juvenile Tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431.

GONTIJO, A. M. de M. C. *et al.* (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, p. 165–172.

GRISOLIA, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, vol. 518, p. 145–150.

GRISOLIA, C. K. (2005). **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, 392 p.

GUILHERME, S. *et al.* (2008) Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 70(3), p. 411-421.

GUSTAVINO, B. *et al.* (2001). Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicines. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 494, p. 151–159.

HAHN, A.; HOCK, B. (1999). Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 18, p. 1421–1424.

HEDDLE, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**. v. 18, p. 187–190.

- HEDDLE, J. A. *et al.* (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research – Genetic Toxicology**. v. 123, p. 61–118.
- HEDDLE, J. A. *et al.* (1991). Micronuclei as a index of Citogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**. v. 18 p. 277–291.
- HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. (1982). Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 104, p. 147–152.
- HORI, T.S.F. *et al.* (2008). Impairment of the stress response in matrinxã juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol. **Comp. Biochem. Physiol. C** v. 147, p. 416-423.
- HORVÁTHOVÁ, E. *et al.* (1998). The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. **Mutation Research – DNA Repair**, Amsterdam, v. 409, p. 163 – 171.
- HOSE, J. E. *et al.* (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern califórnia. **Marine Environmental Research**, Kidlington, v. 22, p. 167-176.
- INOUE, M.H.; OLIVEIRA JR. R.S.; REGITANO, J.B.; TORMENA, C.A.; TORNISIELO, V.L.; CONSTANTIN, J. (2003). Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Planta Daninha** v. 21, p. 313–323.
- IUPAC – The international Union of Pure and Applied Chemistry - <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/610.htm>. Acessado em julho de 2008.
- JABLONIKA, A. *et al.* (1989). Analysis of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of workers with occupational exposure to the mancozeb containing fungicide Novozir Mn80. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 224, p. 143-146.
- JHA, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. v. 23, 3 p. 207-221.
- JIRAUNGKOORSKUL, W. *et al.* (2002) Histopathological effects of Roundup, aglyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Asia**, v. 28, p. 121–127
- KLAUDE, M. *et al.* (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research – DNA Repair**, Amsterdam, v. 363, p. 89-96.
- KOLPIN, D. *et al.* (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. **Sci. Total Environ**. v. 354, p. 191-197.

- KOTTELAT, M. (1997). European freshwater fishes. **Biologia**, v. 52, p. 1-271.
- KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. (2000). Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 453, p. 45-50.
- KUMARAVEL, T. S., JHA, A. N. (2006). Reliable Comet Assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Researchn**, v. 544, p. 7-16.
- KUMARAVEL, T. S. *et al.* (2007). Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**. DOI 10.1007/s10565-007-9043-9 disponível online em <http://www.springer.com/life+sci/cell+biology/journal>. Acessado em julho de 2008.
- LANDRY, D. *et al.* (2005). Leaching of glyphosate and AMPA under two soil management practices in Burgundy vineyards. **Environ. Pollut.** v. 138, p. 191-200.
- LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 147, p. 222-231.
- LOWELL, D. P., OMORI. T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**. v. 23, 3, p. 171-182.
- MAÑAS, F. *et al.* (2008). Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed bu the Comet assay and cytogenetics tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Article in Press. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.09.019
- MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, vol. 96 p. 245-249.
- MARONI, M. *et al.* (2000). Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review, Introduction. **Toxicology**, v. 143, p. 1-118.
- McGAHON, A. J. *et al.* (1995). The end of the (Cell) Line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. (Ed). **Cell Death**. Londres: Academic Press. p. 172-173.
- MATSUMOTO, S.T., *et al.* (2006) Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetic and Molecular Biology**. V. 29(1) p. 148-158
- MENOLI, R. C. R. N. *et al.* (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 496, p. 5-13.
- METCALFE, C. D. (1989). Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**. v. 1, p. 111-129.



MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. (1996). Micronucleus Test in Erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from Two Natural Environments: a Bioassay for the in Situ Detection of Mutagens in Freshwater. **Mutation Research – Genetic Toxicology**, v. 367, p. 245-251.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K.; (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147.

MOLINARI, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, v. 33, p. 261-274.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. (1995). Comparison of the Microgel Electrophoresis Assay and other Assays for Genotoxicity in the Detection of DNA Damage. **Mutation Research – Genetic Toxicology**, v. 345, p. 97-103.

MOORE, M. N. *et al.* (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552 p. 247-268

MOSER, V. C. *et al.* (2001). The Effects of Perinatal Tebuconazole Exposure on Adult Neurological, Immunological, and Reproductive Function in Rats. **TOXICOLOGICAL SCIENCES**, v. 62, p. 339-352.

NAVARRETE, M. H. *et al.* (1997). A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 389, p. 271-277.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, Oak Brook, v. 122, p. 86-94.

OLIVE, P. L. *et al.* (1992). Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 198, p. 259 – 267.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. (1995). Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslink agent. **Experimental Cell Research**, Orlando, v. 221, p. 19-26.

OLIVE, P. L. *et al.* (1998). The comet assay: A new method to examine heterogeneity associated with solid tumors. **Nature Medicine**, New York, v. 4, p. 103-105.

OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149.

- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 123, nº 1, p. 291-298.
- PADRANGI, R. *et al.* (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 26, p. 345-356
- PAN – Pesticide database. Disponível em <http://www.pesticideinfo.org/Index.html>. Acesso em 20/03/2008
- PAYNE, J. F. *et al.* (1987). Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Com. Biochem. Physiol.**, v. 79, p. 15-19.
- PEAKALL, D. W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicol. Ecotoxicology**. News, v. 1 p. 55-60.
- PEIXOTO, F. (2005). Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **CHEMOSPHERE**, V. 61, p. 1115–1122.
- PELLACANI, C. *et al.* (2006). A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. **Aquatic Toxicology**. v. 77, p. 1-10.
- PORTO, J. I. R.; ARAUJO, C. S. O.; FELDBERG, E. (2005) Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292.
- RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Ed.). (1991). **Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética.
- RAMSDORF, W. (2007). **Utilização de duas espécies *Astyanax* (*Astyanax sp B e A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda canguiri – UFPR)**. 127 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná
- REMOR, A. P. *et al.* (2008). Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. **Environment International**. Article in press. (EI-01797). Disponível em [www.elsevier.com/locate/envint](http://www.elsevier.com/locate/envint)
- RODRIGUEZ-CEA, A.; AYLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 442-448.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 722, p. 225-254.

- SASAKI, Y. F. *et al.* (1997). Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 393, p. 133-139.
- SCHMID, W. (1975). The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, p. 9-15.
- SILVA, J. *et al.* (2000). Na alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 241-245.
- SINGH, N. P. *et al.* (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** v. 175, p. 184-191.
- SMITH, E. A., OEHME, F. W. (1992). The Biological activity of glyphosate to plants and animals: A literature review. **Vet. Hum. Toxicol**, v. 34, p. 531-543.
- SOUZA, A. P. (1998). Movimento e degradação do glyphosate e do Imazapyr em solos com diferentes texturas e composição química. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, . 95 p.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. (1999). The comet assay (single cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson, D. S. (Ed.) **Methods in Molecular Biology: DNA repair protocols – eukaryotic systems**, Totowa, v. 113, p. 203-212.
- STEIBLEN, G. *et al.* (2005). Comparison of the relative sensitivity of human lymphocytes and mouse splenocytes to two spindle poisons. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 588, p. 143-151.
- STEWART, Z. A., WESTFALL, M. D., PIENTENPOL, J. A. (2003). Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 24, p. 139-145.
- SZAREK, J.; *et al.* (2000). Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, vol. 50, p. 263-266.
- THEODORAKIS, C. W.; D' SURNEY, S. J.; SHUGART, L. R. (1994). Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 13 p. 1023-1031.
- TITENKO-HOLLAND, N *et al.* (1997). Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 388, p. 85-95.
- UDROIU, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, p. 201-204.

UEDA, T. *et al.* (1992). A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Wat. Sci. Tech.**, v. 25 nº 11, p. 235-240.

Van GASTEL, C.A.M.; Van BRUMMELEN, T. C. (1996). Incorporation of the biomaker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, p. 217 – 225.

VERMEULEN, N. P. E. (1996). **Role of metabolism in chemical toxicity.** In: **Ioannides, C. (Ed), Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects.** CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 29-53.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998) – **Aluminium in Drinking – water – Background document for development of WHO Guidelines for Drinking – water Quality.** Geneva. WHO/SDE/WSH/03.04/53

WILLIAMS, R.C.; METCALFE, C.D. (1992). Development of an *in vitro* Hepatic micronucleus assay with rainbow trout. **Aquatic Toxicology**. v. 23, p. 193-202.

YENDLE, J. E *et al.* (1997). The genetic toxicity of time: Importance of DNA – unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, p. 125-136.

# 7 ANEXOS

## 7.1 TABELAS DE RESULTADOS

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	CONTROLE
Tempo e modo de exposição	CONTROLE		Concentração:

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	50,1	16,0	0	131	0	869	13,1	0	0	2000	2000	45	38	12	4	1	100	78
2	M	33,7	14,0	0	124	0	876	12,4	0	6	1994	2000	40	31	23	5	1	100	96
3	F	23,8	13,0	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	46	33	12	4	5	100	89
4	M	46,7	15,5	0	137	0	863	13,7	0	2	1998	2000	48	27	12	12	1	100	91
5	F	30,3	13,5	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	53	19	21	4	3	100	85
6	M	19,5	12,0	0	122	0	878	12,2	0	3	1997	2000	44	36	12	6	2	100	86
7	M	21,5	13,0	0	135	0	865	13,5	0	8	1992	2000	41	39	16	2	2	100	85
8	M	24,2	12,0	0	114	0	886	11,4	0	1	1999	2000	43	33	24	0	0	100	81
9	F	24,9	13,0	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	37	36	19	4	4	100	102
10	F	29,0	13,5	0	126	0	874	12,6	0	4	1996	2000	42	24	23	9	2	100	105
11	M	26,8	13,0	0	128	0	872	12,8	0	3	1997	2000	44	31	16	4	5	100	95
12	F	17,5	11,0	0	129	0	871	12,9	0	1	1999	2000	35	27	21	14	3	100	123
13	F	18,7	12,0	0	117	0	883	11,7	0	2	1998	2000	32	27	24	15	2	100	128
14	F	19,3	12,5	0	122	0	878	12,2	0	0	2000	2000	40	34	16	9	1	100	97
15	M	32,5	14,0	0	128	0	872	12,8	0	3	1997	2000	42	32	15	10	1	100	96
16	M	21,2	13,0	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	33	37	14	12	4	100	117
17	F	19,7	12,0	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	45	33	13	7	2	100	88
18	M	34,6	14,5	0	127	0	873	12,7	0	1	1999	2000	39	36	18	5	2	100	95
19	F	18,3	11,0	0	127	0	873	12,7	0	1	1999	2000	45	33	17	3	2	100	84
20	F	24,6	13,5	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	68	14	8	10	0	100	60
Média		26,84	13,10	0,00	126,65	0,00	873,35	12,67	0,00	2,65	1997,35		43,1	31,0	16,8	7,0	2,2		94,05
Mediana		24,40	13,00	0,00	127,00	0,00	873,00	12,70	0,00	2,50	1997,50		42,5	33,0	16,0	5,5	2,0		93,00

Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	41,3	14,5	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	34	43	16	5	2	100	98
2	F	31,3	13,5	0	119	0	881	11,9	0	4	1996	2000	37	25	23	12	3	100	119
3	M	24,8	12,6	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	40	23	21	10	6	100	119
4	F	22,5	12,0	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	34	33	24	6	3	100	111
5	F	26,5	12,2	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	39	26	21	10	4	100	114
6	M	26,2	13,1	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	39	36	17	6	2	100	96
7	M	63,3	13,0	0	126	0	874	12,6	0	4	1996	2000	45	24	17	12	2	100	102
8	F	29,4	17,5	0	121	0	879	12,1	0	1	1999	2000	42	29	16	12	1	100	101
9	F	43,7	14,0	0	125	0	875	12,5	0	8	1992	2000	37	36	16	9	2	100	103
10	F	19,0	14,5	0	128	0	872	12,8	0	4	1996	2000	58	20	10	9	3	100	79
11	F	25,0	11,0	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	39	34	17	7	3	100	101
12	M	22,0	12,0	0	117	0	883	11,7	0	1	1999	2000	41	25	19	11	4	100	112
13	M	45,7	15,1	0	120	0	880	12	0	2	1998	2000	44	28	21	3	4	100	95
14	F	19,5	12,0	0	122	0	878	12,2	0	2	1998	2000	44	29	18	5	4	100	96
15	F	21,7	13,0	0	134	0	866	13,4	0	3	1997	2000	51	25	12	9	3	100	88
16	M	24,2	12,0	0	123	0	877	12,3	0	5	1995	2000	41	32	18	6	3	100	98
17	M	24,9	13,0	0	135	0	865	13,5	0	6	1994	2000	56	16	16	10	2	100	86
18	M	33,1	14,8	0	116	0	884	11,6	0	0	2000	2000	38	34	13	11	4	100	109
19	F	26,8	13,0	0	127	0	873	12,7	0	1	1999	2000	37	35	12	13	3	100	110
20	F	17,5	11,0	0	114	0	886	11,4	0	2	1998	2000	48	24	16	10	2	100	94
Média		51,61	15,88	0,00	124,00	0,00	876,00	12,40	0,00	2,90	1997,10		42,2	28,9	17,2	8,8	3,0		101,55
Mediana		50,7	16,05	0,00	124,00	0,00	876,00	12,40	0,00	2,50	1997,50		40,5	28,5	17,0	9,5	3,0		101,00

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	41,3	14,5	0	119	0	881	11,9	0	9	1991	2000	31	28	26	12	3	100	128
2	F	31,3	13,5	0	114	0	886	11,4	0	1	1999	2000	45	31	23	1	0	100	80
3	M	24,8	12,0	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	41	23	17	15	4	100	118
4	F	22,5	12,0	0	137	0	863	13,7	0	3	1997	2000	44	31	14	8	3	100	95
5	F	26,5	13,2	0	116	0	884	11,6	0	3	1997	2000	31	29	21	15	4	100	132
6	M	26,7	13,5	0	122	0	878	12,2	0	2	1998	2000	35	35	17	11	2	100	110
7	M	63,3	17,5	0	141	0	859	14,1	0	6	1994	2000	47	21	23	7	2	100	96
8	F	29,4	14,0	0	130	0	870	13	0	4	1996	2000	48	16	23	11	2	100	103
9	F	43,7	14,5	0	136	0	864	13,6	0	1	1999	2000	35	27	22	12	4	100	123
10	F	19,0	11,0	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	44	27	16	11	2	100	100
11	F	25,0	13,0	0	131	0	869	13,1	0	1	1999	2000	35	32	23	8	2	100	110
12	M	22,0	12,0	0	129	0	871	12,9	0	0	2000	2000	47	31	12	7	3	100	88
13	F	27,0	13,1	0	121	0	879	12,1	0	0	2000	2000	45	22	16	14	3	100	108
14	F	54,4	16,3	0	118	0	882	11,8	0	3	1997	2000	42	35	13	9	1	100	92
15	M	26,8	13,0	0	114	0	886	11,4	0	4	1996	2000	39	36	15	11	1	102	103
16	M	17,5	11,0	0	121	0	879	12,1	0	6	1994	2000	36	23	23	12	6	100	129
17	M	26,1	12,0	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	45	31	11	11	2	100	94
18	F	35,9	14,0	0	116	0	884	11,6	0	9	1991	2000	44	23	21	10	2	100	103
19	F	34,2	13,5	0	119	0	881	11,9	0	5	1995	2000	52	31	10	5	2	100	74
20	M	43,2	14,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	51	17	19	10	3	100	97
Média		32,03	13,38	0,00	124,65	0,00	875,35	12,47	0,00	3,20	1996,80		41,9	27,5	18,3	10,0	2,6		104,15
Mediana		26,88	13,35	0,00	121,50	0,00	878,50	12,15	0,00	2,50	1997,50		44,0	28,5	18,0	11,0	2,0		103,00



Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	45,3	16,0	0	126	0	874	12,6	0	3	1997	2000	58	12	11	15	4	100	95
2	M	53,3	16,0	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	56	14	17	5	8	100	95
3	F	48,0	15,0	0	127	0	873	12,7	0	4	1996	2000	44	21	20	14	1	100	107
4	M	80,0	18,0	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	51	25	10	12	2	100	89
5	F	88,2	18,5	0	120	0	880	12	0	6	1994	2000	32	26	21	14	7	100	138
6	M	60,5	17,0	0	122	0	878	12,2	0	3	1997	2000	37	36	17	8	2	100	102
7	M	58,5	16,5	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	43	21	18	16	2	100	113
8	M	25,1	13,0	0	114	0	886	11,4	0	1	1999	2000	43	32	19	5	1	100	89
9	M	37,8	14,5	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	38	31	16	14	1	100	109
10	F	57,4	16,5	0	113	0	887	11,3	0	1	1999	2000	50	22	14	10	4	100	96
11	F	34,0	13,5	0	105	0	895	10,5	0	3	1997	2000	43	23	20	11	3	100	108
12	F	82,0	18,0	0	110	0	890	11	0	7	1993	2000	45	19	23	10	3	100	107
13	M	55,3	16,0	0	142	0	858	14,2	0	2	1998	2000	51	19	18	9	3	100	94
14	F	63,3	16,0	0	122	0	878	12,2	0	11	1989	2000	33	24	25	14	4	100	132
15	F	81,2	17,5	0	126	0	874	12,6	0	3	1997	2000	58	12	15	13	2	100	89
16	F	64,3	16,0	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	54	17	14	10	5	100	95
17	M	65,8	17,0	0	118	0	882	11,8	0	3	1997	2000	58	11	13	12	6	100	97
18	M	57,5	16,5	0	118	0	882	11,8	0	5	1995	2000	39	21	19	17	4	100	126
19	F	35,5	14,0	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	39	25	21	11	4	100	116
20	F	48,0	16,0	0	123	0	877	12,3	0	1	1999	2000	56	16	12	13	3	100	91
Média		57,05	16,08	0,00	121,40	0,00	878,60	12,14	0,00	3,35	1996,65		46,4	21,4	17,2	11,7	3,5		104,40
Mediana		57,45	16,00	0,00	122,00	0,00	878,00	12,20	0,00	3,00	1997,00		44,5	21,0	17,5	12,0	3,0		99,50

Tempo e modo de exposição		JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i> 5 dias - hídrica	Xenobionte: ROUNDUP Concentração: 6,6 µl/litro (3,16 mg/l)
---------------------------	--	--	---

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	61,8	16,0	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	44	26	14	11	5	100	107
2	M	27,9	12,5	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	42	35	12	11	0	100	92
3	F	26,1	12,0	0	115	0	885	11,5	0	2	1998	2000	44	23	18	13	2	100	106
4	F	35,9	14,0	0	126	0	874	12,6	0	3	1997	2000	43	23	21	9	4	100	108
5	M	73,5	18,0	0	128	0	872	12,8	0	5	1995	2000	52	16	18	13	1	100	95
6	M	131,0	21,0	0	119	0	881	11,9	0	7	1993	2000	36	38	17	6	3	100	102
7	M	59,0	16,5	0	128	0	872	12,8	0	3	1997	2000	50	16	15	15	4	100	107
8	M	50,8	15,5	0	109	0	891	10,9	0	2	1998	2000	50	24	12	13	1	100	91
9	M	40,5	15,0	0	124	0	876	12,4	0	0	2000	2000	36	26	23	11	4	100	121
10	M	116,9	22,0	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	44	25	17	12	2	100	103
11	M	76,5	18,0	0	126	0	874	12,6	0	7	1993	2000	31	37	16	12	4	100	121
12	M	70,3	17,0	0	119	0	881	11,9	0	9	1991	2000	45	25	18	10	2	100	99
13	F	26,7	13,3	0	115	0	885	11,5	0	11	1989	2000	37	34	15	10	4	100	110
14	F	22,5	12,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	56	11	18	14	1	100	93
15	F	26,5	12,2	0	122	0	878	12,2	0	1	1999	2000	58	12	13	13	4	100	93
16	M	28,1	13,6	0	115	0	885	11,5	0	1	1999	2000	39	24	18	17	2	100	119
17	F	32,5	13,9	0	132	0	868	13,2	0	0	2000	2000	45	23	16	14	2	100	105
18	F	28,3	13,6	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	30	28	23	18	1	100	132
19	F	26,7	13,3	0	123	0	877	12,3	0	1	1999	2000	57	14	13	14	2	100	90
20	M	41,4	15,0	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	55	17	12	12	4	100	93
Média		50,14	15,22	0,00	122,00	0,00	878,00	12,20	0,00	3,30	1996,70		44,7	23,9	16,5	12,4	2,6		104,35
Mediana		38,19	14,50	0,00	122,50	0,00	877,50	12,25	0,00	2,00	1998,00		44,0	24,0	16,5	12,5	2,0		104,00

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/litro (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	61,0	16,0	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	33	35	19	12	1	100	113
2	M	56,5	16,0	0	117	0	883	11,7	0	6	1994	2000	41	26	24	7	2	100	103
3	M	41,5	14,0	0	119	0	881	11,9	0	3	1997	2000	52	20	15	11	2	100	91
4	M	53,0	15,5	0	126	0	874	12,6	0	4	1996	2000	40	31	15	8	6	100	109
5	F	55,0	16,0	0	131	0	869	13,1	0	5	1995	2000	39	28	17	13	3	100	113
6	M	30,8	13,0	0	128	0	872	12,8	0	3	1997	2000	41	36	13	6	4	100	96
7	M	44,0	15,0	0	121	0	879	12,1	1	1	1998	2000	30	27	25	13	5	100	136
8	F	69,0	17,0	0	119	0	881	11,9	0	1	1999	2000	47	31	16	4	2	100	83
9	F	56,5	16,0	0	120	0	880	12	0	2	1998	2000	38	35	17	7	3	100	102
10	F	22,2	11,5	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	35	39	21	4	1	100	97
11	F	55,3	15,5	0	113	0	887	11,3	0	3	1997	2000	41	32	17	7	3	100	99
12	M	52,3	15,0	0	123	0	877	12,3	0	5	1995	2000	45	22	23	6	4	100	102
13	F	50,1	16,0	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	37	27	16	15	5	100	124
14	M	33,7	14,0	0	114	0	886	11,4	0	5	1995	2000	41	21	19	13	6	100	122
15	F	31,3	13,5	0	120	0	880	12	0	3	1997	2000	39	26	18	13	4	100	117
16	M	43,0	15,0	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	55	23	13	5	4	100	80
17	F	37,0	15,0	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	47	33	11	5	4	100	86
18	M	32,0	14,3	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	50	20	18	7	5	100	97
19	F	35,0	14,4	0	119	0	881	11,9	0	1	1999	2000	56	17	13	11	3	100	88
20	M	51,0	15,5	0	134	0	866	13,4	0	5	1995	2000	40	26	22	10	2	100	108
Média		45,51	14,91	0,00	122,35	0,00	877,65	12,24	0,05	3,20	1996,75		42,4	27,8	17,6	8,9	3,5		103,30
Mediana		47,07	15,00	0,00	120,50	0,00	879,50	12,05	0,00	3,00	1997,00		41,0	27,0	17,0	7,5	3,5		102,00

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	53,0	15,5	0	112	0	888	11,2	0	4	1996	2000	45	23	17	12	3	100	105
2	F	55,3	16,0	0	109	0	891	10,9	0	3	1997	2000	40	24	23	12	1	100	110
3	M	30,8	13,0	0	147	0	853	14,7	0	3	1997	2000	37	21	25	16	1	100	123
4	M	44,0	15,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	44	25	16	10	5	100	107
5	F	43,8	15,5	0	101	0	899	10,1	0	4	1996	2000	34	25	22	15	4	100	130
6	F	22,7	12,0	0	122	0	878	12,2	0	3	1997	2000	31	29	27	12	1	100	123
7	F	33,0	14,0	0	107	0	893	10,7	0	5	1995	2000	35	33	22	7	3	100	110
8	M	75,5	17,5	0	114	0	886	11,4	0	1	1999	2000	46	30	14	9	1	100	89
9	M	55,6	16,5	0	117	0	883	11,7	0	4	1996	2000	36	32	16	11	5	100	91
10	M	68,3	17,0	0	126	0	874	12,6	0	4	1996	2000	51	24	15	7	3	100	87
11	M	71,7	17,3	0	115	0	885	11,5	0	3	1997	2000	29	31	23	16	1	100	129
12	F	35,9	14,0	0	139	0	861	13,9	0	9	1991	2000	38	23	19	13	7	100	128
13	M	73,5	18,0	0	117	0	883	11,7	0	2	1998	2000	30	34	31	4	1	100	112
14	M	57,2	16,0	0	122	0	878	12,2	0	4	1996	2000	55	17	12	14	2	100	117
15	M	56,7	16,5	0	116	0	884	11,6	0	3	1997	2000	33	25	28	8	6	100	129
16	F	23,3	12,0	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	39	25	33	1	2	100	102
17	F	31,0	13,2	0	111	0	889	11,1	0	3	1997	2000	60	14	13	11	2	100	81
18	M	26,8	13,5	0	112	0	888	11,2	0	4	1996	2000	41	21	32	4	2	100	105
19	M	64,0	17,5	0	147	0	853	14,7	0	1	1999	2000	65	12	12	10	1	100	70
20	F	28,5	13,5	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	61	12	19	8	0	100	74
Média		47,53	15,18	0,00	119,85	0,00	880,15	11,99	0,00	3,40	1996,60		42,5	24,0	21,0	10,0	2,6		106,10
Mediana		48,50	15,50	0,00	117,00	0,00	883,00	11,70	0,00	3,00	1997,00		39,5	24,5	20,5	10,5	2,0		108,50

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	39,5	14,5	0	145	0	855	14,5	0	8	1992	2000	43	36	8	11	2	100	93
2	M	47,5	15,0	0	134	0	866	13,4	0	1	1999	2000	55	12	13	10	10	100	108
3	M	43,1	16,5	0	128	0	872	12,8	0	2	1998	2000	61	15	16	4	4	100	75
4	F	43,8	15,5	0	116	0	884	11,6	0	3	1997	2000	51	29	10	7	7	104	98
5	F	21,1	12,0	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	53	16	11	12	8	100	106
6	F	33,0	14,0	0	120	0	880	12	0	4	1996	2000	49	26	16	6	3	100	88
7	M	75,5	17,5	0	116	0	884	11,6	0	7	1993	2000	41	16	23	15	5	100	127
8	F	48,9	15,5	0	122	0	878	12,2	0	3	1997	2000	40	23	17	10	10	100	127
9	F	52,5	16,0	0	133	0	867	13,3	0	4	1996	2000	40	22	15	17	6	100	127
10	F	61,5	17,2	0	116	0	884	11,6	0	2	1998	2000	44	26	21	6	3	100	98
11	F	34,5	14,5	0	121	0	879	12,1	0	6	1994	2000	31	30	14	14	11	100	144
12	F	74,8	18,0	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	46	21	17	14	2	100	105
13	F	54,5	16,1	0	145	0	855	14,5	0	3	1997	2000	50	21	12	12	5	100	101
14	F	72,3	17,1	0	120	0	880	12	0	2	1998	2000	63	12	7	12	6	100	86
15	M	59,0	17,0	0	139	0	861	13,9	0	1	1999	2000	45	29	13	11	2	100	96
16	M	62,1	17,2	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	60	16	13	7	4	100	79
17	M	44,7	15,3	0	116	0	884	11,6	0	8	1992	2000	31	26	28	10	5	100	132
18	F	59,2	16,7	0	121	0	879	12,1	0	6	1994	2000	36	21	19	15	9	100	140
19	M	48,7	15,8	0	111	0	889	11,1	0	6	1994	2000	51	16	10	11	12	100	117
20	M	56,0	16,2	0	115	0	885	11,5	0	1	1999	2000	45	27	14	12	2	100	99
Média		51,61	15,88	0,00	124,55	0,00	875,45	12,46	0,00	3,65	1996,35		46,8	22,0	14,9	10,8	5,8		107,3
Mediana		50,7	16,05	0,00	121,00	0,00	879,00	12,10	0,00	3,00	1997,00		45,5	21,5	14,0	11,0	5,0		103,0

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	61,0	16,0	1	115	0	884	11,5	1	3	1996	2000	12	41	26	15	6	100	162
2	M	55,5	16,0	0	141	0	859	14,1	0	1	1999	2000	30	36	17	16	1	100	122
3	M	41,5	14,0	0	134	0	866	13,4	0	2	1998	2000	34	32	23	7	4	100	115
4	F	45,2	16,0	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	41	25	21	8	5	100	111
5	M	60,5	17,0	0	115	0	885	11,5	0	21	1979	2000	51	18	18	14	0	101	96
6	M	58,5	16,5	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	50	19	16	9	6	100	102
7	M	43,1	16,5	0	111	0	889	11,1	0	7	1993	2000	34	26	21	14	5	100	130
8	F	43,8	15,5	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	36	25	27	9	3	100	118
9	F	21,1	12,0	0	110	0	890	11	0	4	1996	2000	49	21	14	15	1	100	98
10	F	41,2	14,0	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	45	18	17	18	2	100	114
11	M	69,3	16,5	0	115	0	885	11,5	0	6	1994	2000	31	34	26	7	2	100	115
12	F	48,1	15,5	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	32	17	19	21	11	100	162
13	M	55,0	16,5	0	110	0	890	11	0	3	1997	2000	45	25	19	10	1	100	97
14	M	67,5	17,0	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	39	28	20	12	1	100	108
15	M	62,2	16,0	0	129	0	871	12,9	0	5	1995	2000	51	22	23	3	1	100	81
16	M	28,1	12,5	0	115	0	885	11,5	0	11	1989	2000	61	16	10	4	9	100	84
17	F	26,1	12,0	0	132	0	868	13,2	0	5	1995	2000	51	14	17	16	2	100	104
18	F	49,8	16,0	0	134	0	866	13,4	0	2	1998	2000	45	19	23	11	2	100	106
19	F	58,6	16,5	0	112	0	888	11,2	0	4	1996	2000	34	27	25	12	2	100	121
20	F	65,0	16,5	0	121	0	879	12,1	0	1	1999	2000	33	23	18	20	6	100	143
Média		50,06	15,43	0,05	121,35	0,00	878,60	12,14	0,05	4,75	1995,20		40,2	24,3	20,0	12,1	3,5		114,5
Mediana		52,40	16,00	0,00	119,50	0,00	880,50	11,95	0,00	3,50	1996,00		40,0	24,0	19,5	12,0	2,0		112,5

Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	62,1	16,5	0	123	0	877	12,3	0	5	1995	2000	26	32	25	13	4	100	137
2	F	45,3	14,5	0	131	0	869	13,1	0	7	1993	2000	27	34	21	15	3	100	133
3	F	64,0	16,0	0	111	0	889	11,1	0	11	1989	2000	21	32	31	12	4	100	146
4	M	76,1	18,0	0	116	0	884	11,6	0	4	1996	2000	28	26	30	11	5	100	139
5	M	46,5	15,0	0	112	0	888	11,2	0	6	1994	2000	28	27	26	17	2	100	138
6	M	64,1	13,0	0	139	0	861	13,9	0	2	1998	2000	36	33	14	14	3	100	115
7	F	58,7	16,0	0	126	0	874	12,6	0	9	1991	2000	29	30	20	19	2	100	135
8	F	43,7	14,0	0	109	0	891	10,9	0	2	1998	2000	34	22	25	14	5	100	134
9	F	62,3	14,5	0	124	0	876	12,4	0	2	1998	2000	31	26	26	12	5	100	134
10	F	48,5	15,0	0	132	0	868	13,2	0	4	1996	2000	31	30	23	14	2	100	126
11	F	48,0	15,0	0	111	0	889	11,1	0	5	1995	2000	27	26	29	15	3	100	141
12	M	66,7	16,5	0	118	0	882	11,8	0	3	1997	2000	24	29	30	11	6	100	146
13	F	58,3	16,0	0	125	0	875	12,5	0	4	1996	2000	36	31	21	10	2	100	111
14	F	65,0	16,5	0	116	0	884	11,6	0	6	1994	2000	34	22	25	16	3	100	132
15	F	47,2	14,5	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	37	28	21	11	3	100	115
16	F	65,3	17,5	0	117	0	883	11,7	0	2	1998	2000	29	31	17	21	2	100	136
17	M	72,0	17,5	0	115	0	885	11,5	0	6	1994	2000	30	34	23	9	4	100	123
18	M	46,5	15,0	0	129	0	871	12,9	0	5	1995	2000	35	29	21	8	7	100	123
19	M	63,3	13,0	0	125	0	875	12,5	0	6	1994	2000	41	20	21	12	6	100	122
20	F	56,7	15,5	0	112	0	888	11,2	0	7	1993	2000	34	23	26	15	2	100	128
Média		58,01	15,37	0,00	121,10	0,00	878,90	12,11	0,00	4,90	1995,10		30,9	28,3	23,8	13,5			130,70
Mediana		60,41	15,00	0,00	120,50	0,00	879,50	12,05	0,00	5,00	1995,00		30,5	29,0	24,0	13,5			133,50

Espécie:	JUNDIA - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/l (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	compr. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	41,0	14,0	0	145	0	855	14,5	0	2	1998	2000	48	21	19	11	1	100	96
2	M	45,1	15,0	0	109	0	891	10,9	0	3	1997	2000	45	29	12	9	5	100	100
3	M	27,5	13,0	0	124	0	876	12,4	0	4	1996	2000	48	27	12	11	2	100	92
4	M	42,2	15,0	0	115	0	885	11,5	0	2	1998	2000	50	17	14	12	7	100	109
5	F	36,0	13,5	0	112	0	888	11,2	0	5	1995	2000	51	16	14	13	6	100	107
6	F	41,5	15,0	0	123	0	877	12,3	0	1	1999	2000	55	21	6	15	3	100	90
7	F	58,9	17,3	0	133	0	867	13,3	0	9	1991	2000	48	19	23	9	1	100	96
8	M	45,9	16,0	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	30	31	21	13	5	100	132
9	M	55,2	16,0	0	137	0	863	13,7	0	2	1998	2000	45	27	14	11	3	100	100
10	M	30,5	14,0	0	132	0	868	13,2	0	5	1995	2000	36	30	17	9	8	100	123
11	F	52,7	16,5	0	138	0	862	13,8	0	7	1993	2000	51	14	18	15	2	100	103
12	F	25,1	13,0	0	110	0	890	11	0	3	1997	2000	49	19	19	10	3	100	99
13	M	44,3	16,0	0	117	0	883	11,7	0	6	1994	2000	55	16	14	13	2	100	91
14	M	55,1	16,0	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	51	25	14	10	2	102	91
15	F	48,5	15,0	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	56	17	13	9	5	100	90
16	M	65,7	16,5	0	117	0	883	11,7	0	6	1994	2000	43	20	18	11	8	100	121
17	F	71,3	17,0	0	126	0	874	12,6	0	1	1999	2000	44	23	15	15	3	100	110
18	M	61,0	17,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	47	20	16	12	5	100	108
19	M	55,2	16,0	0	123	0	877	12,3	0	0	2000	2000	42	27	17	12	2	100	105
20	F	58,6	16,5	0	114	0	886	11,4	0	1	1999	2000	52	21	12	10	5	100	95
Média		48,07	15,42	0,00	124,60	0,00	875,40	12,46	0,00	3,35	1996,65		47,3	22,0	15,4	11,5			102,90
Mediana		47,20	16,00	0,00	123,50	0,00	876,50	12,35	0,00	3,00	1997,00		48,0	21,0	14,5	11,0			100,00



Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/litro (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	28,7	13,5	0	105	0	895	10,5	0	3	1997	2000	55	22	13	7	3	100	81
2	M	41,3	15,0	0	125	0	875	12,5	0	5	1995	2000	41	29	21	5	4	100	102
3	F	58,2	16,5	0	120	0	880	12	0	3	1997	2000	39	27	26	4	4	100	107
4	F	34,0	13,5	0	116	0	884	11,6	0	5	1995	2000	34	25	23	10	8	100	133
5	F	63,2	16,5	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	37	21	19	16	7	100	135
6	M	25,1	13,0	0	114	0	886	11,4	0	6	1994	2000	50	20	18	11	1	100	93
7	M	37,8	14,5	0	137	0	863	13,7	0	4	1996	2000	57	16	13	11	3	100	87
8	F	57,4	16,5	0	125	0	875	12,5	0	1	1999	2000	45	25	16	9	5	100	104
9	F	34,0	13,5	0	115	0	885	11,5	0	6	1994	2000	38	22	21	14	5	100	126
10	F	82,0	18,0	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	39	21	27	8	5	100	119
11	M	44,0	15,0	0	127	0	873	12,7	1	3	1996	2000	35	27	23	14	1	100	119
12	F	69,0	17,0	0	116	0	884	11,6	0	2	1998	2000	61	12	13	12	2	100	82
13	F	56,5	16,0	0	118	0	882	11,8	0	5	1995	2000	58	16	14	9	3	100	83
14	F	22,2	11,5	0	120	0	880	12	0	4	1996	2000	45	23	21	9	2	100	100
15	F	55,3	15,5	0	129	0	871	12,9	0	1	1999	2000	34	25	17	15	9	100	140
16	M	52,3	15,0	0	126	0	874	12,6	0	4	1996	2000	49	23	22	5	1	100	86
17	M	45,3	16,0	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	45	29	11	8	7	100	103
18	M	53,3	16,0	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	32	34	21	12	1	100	116
19	F	48,0	15,0	0	127	0	873	12,7	0	4	1996	2000	37	32	22	8	1	100	104
20	M	57,5	16,5	0	135	0	865	13,5	0	2	1998	2000	39	35	13	9	4	100	104
Média		48,26	15,20	0,00	123,65	0,00	876,35	12,37	0,05	3,55	1996,40		43,5	24,2	18,7	9,8	3,8		106,2
Mediana		50,15	15,25	0,00	125,00	0,00	875,00	12,50	0,00	4,00	1996,00		40,0	24,0	20,0	9,0	3,5		104,0

Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/l (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	41,2	14,0	0	109	0	891	10,9	0	1	1999	2000	49	21	15	13	2	100	98
2	M	69,3	16,5	0	114	0	886	11,4	0	9	1991	2000	51	23	14	11	1	100	88
3	F	47,7	15,5	0	125	0	875	12,5	0	6	1994	2000	45	26	16	11	2	100	99
4	M	54,3	16,5	0	128	0	872	12,8	0	2	1998	2000	36	21	19	16	8	100	139
5	M	41,3	14,5	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	61	14	11	10	4	100	82
6	F	31,3	13,5	0	112	0	888	11,2	0	5	1995	2000	50	26	11	12	1	100	88
7	M	44,6	15,0	0	110	0	890	11	0	6	1994	2000	55	20	10	9	6	100	91
8	F	43,2	14,0	0	105	0	895	10,5	0	2	1998	2000	45	24	19	8	4	100	102
9	M	55,7	16,5	0	121	0	879	12,1	0	1	1999	2000	51	21	11	12	5	100	99
10	F	45,6	15,5	0	126	0	874	12,6	0	5	1995	2000	39	25	18	11	7	100	122
11	M	63,2	16,5	0	119	0	881	11,9	0	5	1995	2000	56	19	12	4	9	100	91
12	F	43,1	15,5	0	117	0	883	11,7	0	5	1995	2000	41	21	19	17	2	100	118
13	M	48,9	15,5	0	105	0	895	10,5	0	2	1998	2000	37	28	18	13	4	100	119
14	F	56,8	16,0	0	122	0	878	12,2	0	11	1989	2000	41	24	21	12	2	100	110
15	M	55,3	16,0	0	124	0	876	12,4	0	9	1991	2000	39	29	24	7	1	100	102
16	F	65,8	16,5	0	136	0	864	13,6	0	2	1998	2000	44	25	13	9	9	100	114
17	M	61,5	16,0	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	58	23	14	4	1	100	67
18	F	52,2	16,0	0	137	0	863	13,7	0	9	1991	2000	36	22	22	14	6	100	132
19	M	54,3	16,0	0	141	0	859	14,1	0	6	1994	2000	43	14	14	16	13	100	142
20	M	55,7	16,0	0	125	0	875	12,5	0	4	1996	2000	37	25	26	8	4	100	117
Média		51,27	15,58	0,00	120,80	0,00	879,20	12,08	0,00	4,85	1995,15		45,7	22,6	16,4	10,9	4,6		106,00
Mediana		52,20	16,00	0,00	121,50	0,00	878,50	12,15	0,00	5,00	1995,00		44,5	23,0	15,5	11,0	4,0		102,0

Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (F)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	41,5	14,0	0	115	0	885	11,5	0	9	1991	2000	45	24	17	10	4	100	104
2	M	53,0	15,5	0	120	0	880	12	0	7	1993	2000	41	23	25	8	3	100	109
3	F	26,1	12,0	0	117	0	883	11,7	0	2	1998	2000	35	26	26	10	3	100	120
4	F	35,9	14,0	0	128	0	872	12,8	0	3	1997	2000	34	31	21	12	2	100	117
5	M	69,3	16,5	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	45	21	15	13	6	100	114
6	F	47,7	15,5	0	100	0	900	10	0	2	1998	2000	36	27	25	7	5	100	118
7	M	25,1	13,0	0	133	0	867	13,3	0	5	1995	2000	41	25	18	10	6	100	115
8	M	37,8	14,5	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	37	33	15	10	5	100	113
9	F	64,0	17,5	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	41	26	18	10	5	100	112
10	M	42,1	14,0	0	126	0	874	12,6	0	1	1999	2000	33	34	21	8	4	100	116
11	M	37,8	14,5	0	139	0	861	13,9	0	6	1994	2000	43	23	17	11	6	100	114
12	F	57,4	16,5	0	125	0	875	12,5	0	5	1995	2000	42	24	17	10	7	100	116
13	F	34,0	13,5	0	113	0	887	11,3	0	0	2000	2000	33	32	22	9	4	100	119
14	M	26,2	13,1	0	132	0	868	13,2	0	5	1995	2000	36	29	19	13	3	100	118
15	M	63,3	13,0	0	137	0	863	13,7	0	2	1998	2000	42	23	17	13	5	100	116
16	F	29,4	13,0	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	40	29	15	9	7	100	114
17	F	57,4	16,5	0	118	0	882	11,8	0	9	1991	2000	40	27	19	8	6	100	113
18	F	34,0	13,5	0	105	0	895	10,5	0	2	1998	2000	37	32	16	12	3	100	112
19	F	34,0	13,5	0	104	0	896	10,4	0	3	1997	2000	45	22	15	10	8	100	114
20	F	35,6	13,5	0	103	0	897	10,3	0	3	1997	2000	35	30	19	11	5	100	121
Média		42,58	14,36	0,00	120,00	0,00	880,00	12,00	0,00	3,90	1996,10		39,1	27,1	18,9	10,2	4,9		114,75
Mediana		37,80	14,00	0,00	119,00	0,00	881,00	11,90	0,00	3,00	1997,00		40,0	26,5	18,0	10,0	5,0		114,50

Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (F)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocr		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	41,2	14,0	0	99	0	901	9,9	1	4	1995	2000	43	17	19	17	4	100	150
2	M	69,3	16,5	0	115	0	885	11,5	0	11	1989	2000	42	20	20	11	7	100	152
3	F	47,7	15,5	0	109	0	891	10,9	0	6	1994	2000	40	18	25	16	1	100	151
4	M	54,3	16,5	0	126	0	874	12,6	0	6	1994	2000	33	31	20	14	2	100	129
5	M	68,3	17,0	0	116	0	884	11,6	0	12	1988	2000	26	33	22	16	3	100	136
6	M	71,7	17,3	0	112	0	888	11,2	0	2	1998	2000	43	23	15	15	4	100	134
7	F	33,8	14,0	0	130	0	870	13	0	2	1998	2000	46	21	14	11	8	100	142
8	F	62,1	16,5	0	124	0	876	12,4	0	12	1988	2000	41	21	16	15	7	100	147
9	F	45,3	14,5	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	26	29	21	21	3	100	143
10	F	64,0	17,5	0	125	0	875	12,5	0	5	1995	2000	44	22	19	9	6	100	143
11	M	76,1	18,0	0	99	0	901	9,9	0	18	1982	2000	41	24	16	14	5	100	137
12	M	46,5	15,0	0	90	0	910	9	0	2	1998	2000	36	23	25	12	4	100	151
13	M	32,5	14,5	0	134	0	866	13,4	0	6	1994	2000	36	31	14	13	6	100	128
14	F	21,2	13,2	0	117	0	883	11,7	0	5	1995	2000	27	31	22	17	3	100	139
15	F	19,7	12,8	0	118	0	882	11,8	0	12	1988	2000	46	21	19	9	5	100	141
16	M	34,6	14,1	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	41	24	18	15	2	100	133
17	M	23,3	13,6	0	110	0	890	11	0	1	1999	2000	43	25	11	12	9	100	136
18	M	34,0	14,5	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	44	23	16	11	6	100	138
19	F	65,8	17,1	0	136	0	864	13,6	0	3	1997	2000	51	19	15	13	2	100	130
20	F	35,8	14,6	0	117	0	883	11,7	0	4	1996	2000	25	34	21	15	5	100	138
Média		47,36	15,34	0,00	118,30	0,00	881,70	11,83	0,05	6,00	1993,95		24,5	38,7	13,8	18,4	13,8		139,90
Mediana		45,88	14,80	0,00	117,50	0,00	882,50	11,75	0,00	4,50	1995,00		23,0	41,0	14,0	19,0	14,0		138,50

Espécie:	JUNDIÁ - <i>Rhamdia quelen</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (F)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	31,3	13,5	0	126	1	873	12,6	0	5	1995	2000	34	22	25	10	9	100	138
2	M	24,8	12,0	0	101	0	899	10,1	0	2	1998	2000	23	34	23	13	7	100	147
3	F	22,5	12,0	0	114	0	886	11,4	0	5	1995	2000	35	26	21	12	6	100	128
4	M	35,6	14,5	0	110	0	890	11	0	8	1992	2000	33	24	21	15	7	100	139
5	F	31,0	14,0	0	115	0	885	11,5	0	6	1994	2000	30	25	21	15	9	100	148
6	F	33,8	14,0	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	34	31	15	12	8	100	129
7	F	34,5	14,5	0	121	0	879	12,1	0	5	1995	2000	32	25	27	13	3	100	130
8	F	29,4	14,0	0	134	0	866	13,4	0	9	1991	2000	42	19	17	15	7	100	126
9	M	40,5	15,0	0	125	0	875	12,5	1	14	1985	2000	32	22	19	22	5	100	146
10	F	33,0	14,0	0	119	0	881	11,9	0	4	1996	2000	21	31	26	18	4	100	153
11	M	58,5	16,0	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	35	26	14	20	5	100	134
12	F	48,9	15,5	0	108	0	892	10,8	0	2	1998	2000	18	44	17	13	8	100	149
13	M	25,6	12,0	0	94	0	906	9,4	0	13	1987	2000	22	38	20	16	4	100	142
14	F	22,5	12,0	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	27	31	19	18	5	100	143
15	F	34,0	13,5	0	117	0	883	11,7	0	11	1989	2000	27	27	27	12	7	100	145
16	F	30,1	14,0	0	118	0	882	11,8	0	18	1982	2000	23	36	25	13	3	100	137
17	F	25,0	11,0	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	35	23	14	19	9	100	144
18	M	22,0	12,0	0	102	0	898	10,2	0	7	1993	2000	31	27	21	13	9	101	144
19	M	56,3	16,0	0	115	0	885	11,5	0	0	2000	2000	31	27	17	17	8	100	144
20	M	31,1	14,0	0	110	0	890	11	0	6	1994	2000	28	25	27	11	9	100	148
Média		33,52	13,68	0,00	117,20	0,05	882,75	11,72	0,05	6,20	1993,75		29,7	28,2	20,8	14,9	6,6		140,70
Mediana		31,20	14,00	0,00	117,50	0,00	882,50	11,75	0,00	5,00	1995,00		31,0	26,5	21,0	14,0	7,0		143,50

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	CONTROLE
Tempo e modo de exposição	CONTROLE	Concentração:	

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	4,0	6,0	0	118	0	882	11,8	0	2	1998	2000	40	45	5	8	2	100	87
2	F	6,4	7,5	0	137	0	863	13,7	0	5	1995	2000	37	47	10	6	0	100	85
3	M	7,2	7,5	0	141	0	859	14,1	0	4	1996	2000	45	39	2	10	4	100	89
4	M	8,3	8,0	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	36	33	14	14	3	100	115
5	M	4,3	6,5	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	44	30	9	16	1	100	100
6	F	4,9	7,0	0	129	0	871	12,9	0	4	1996	2000	49	40	10	1	0	100	63
7	F	8,4	8,0	0	115	0	885	11,5	0	0	2000	2000	30	44	8	18	0	100	114
8	F	3,6	6,0	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	32	37	11	15	5	100	124
9	M	6,8	7,5	0	144	0	856	14,4	0	7	1993	2000	44	36	9	9	2	100	89
10	M	3,9	6,0	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	45	35	12	8	0	100	83
11	F	6,5	7,0	0	139	0	861	13,9	0	2	1998	2000	30	43	15	11	1	100	110
12	F	4,0	6,0	0	145	0	855	14,5	0	1	1999	2000	38	39	6	14	3	100	105
13	M	6,4	7,5	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	33	41	8	13	5	100	116
14	F	8,3	8,0	0	143	0	857	14,3	0	3	1997	2000	50	36	7	6	1	100	72
15	M	8,0	8,0	0	127	0	873	12,7	0	1	1999	2000	31	39	13	10	7	100	123
16	M	6,3	7,0	0	142	0	858	14,2	0	4	1996	2000	33	37	12	12	6	100	121
17	F	4,5	6,5	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	42	31	7	16	4	100	109
18	M	4,6	6,5	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	37	41	8	12	2	100	101
19	F	6,7	7,0	0	120	0	880	12	0	2	1998	2000	45	37	9	6	3	100	85
20	F	8,5	8,0	0	135	0	865	13,5	0	4	1996	2000	48	32	12	4	2	98	76
Média		6,08	7,08	0,00	130,65	0,00	869,35	13,07	0,00	2,90	1997,10		39,5	38,1	9,4	10,5	2,6		98,35
Mediana		6,43	7,00	0,00	132,00	0,00	868,00	13,20	0,00	3,00	1997,00		39,0	38,0	9,0	10,5	2,0		100,50
des/pad		1,7	0,7	0,0	10,2	0,0	10,2	1,0	0,0	1,6	1,6	0,0	6,6	4,6	3,2	4,5	2,1	0,4	18,1

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	4,7	6,5	0	113	0	1000	11,3	0	1	1999	2000	34	32	26	4	4	100	112
2	F	3,7	6,0	0	132	0	1000	13,2	0	2	1998	2000	32	29	25	12	2	100	123
3	M	4,7	6,5	0	136	0	1000	13,6	0	2	1998	2000	34	26	20	15	5	100	131
4	M	4,8	6,5	0	120	0	1000	12	0	2	1998	2000	26	44	27	1	2	100	109
5	M	6,5	7,5	0	112	0	1000	11,2	0	7	1993	2000	31	45	20	4	0	100	97
6	F	7,4	9,0	0	124	0	1000	12,4	0	0	2000	2000	33	40	12	11	4	100	113
7	F	7,0	8,0	0	110	0	1000	11	0	1	1999	2000	37	37	11	9	6	100	110
8	M	5,2	6,5	0	113	0	1000	11,3	0	1	1999	2000	27	34	25	10	4	100	130
9	F	5,2	7,0	0	139	0	1000	13,9	0	6	1994	2000	25	42	21	9	3	100	123
10	F	2,8	5,5	0	130	0	1000	13	0	2	1998	2000	37	40	12	9	2	100	99
11	M	4,0	5,5	0	134	0	1000	13,4	0	2	1998	2000	43	37	7	11	2	100	92
12	M	3,8	6,5	0	140	0	1000	14	0	3	1997	2000	37	32	20	10	1	100	106
13	F	4,9	6,5	0	128	0	1000	12,8	0	1	1999	2000	26	46	20	7	1	100	111
14	F	3,6	6,0	0	138	0	1000	13,8	0	4	1996	2000	31	34	18	10	7	100	128
15	M	5,3	7,0	0	122	0	1000	12,2	0	2	1998	2000	31	44	16	4	5	100	108
16	F	4,8	6,5	0	137	0	1000	13,7	0	5	1995	2000	29	45	23	2	1	100	101
17	M	4,2	6,5	0	126	0	1000	12,6	0	6	1994	2000	27	45	20	8	0	100	109
18	F	5,5	7,0	0	114	0	1000	11,4	0	3	1997	2000	25	45	14	11	5	100	126
19	F	4,9	7,0	0	115	0	1000	11,5	0	1	1999	2000	38	43	12	6	1	100	89
20	M	5,0	7,0	0	130	0	1000	13	0	2	1998	2000	38	45	11	4	2	100	87
Média		4,90	6,73	0,00	125,65	0,00	1000,00	12,57	0,00	2,65	1997,35		32,1	39,3	18,0	7,9	2,9		110,20
Mediana		4,85	6,50	0,00	127,00	0,00	1000,00	12,70	0,00	2,00	1998,00		31,5	41,0	20,0	9,0	2,0		109,50
des/pad		1,1	0,8	0,0	10,2	0,0	0,0	1,0	0,0	2,0	2,0	0,0	5,2	6,2	5,8	3,7	2,0	0,0	13,5

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	3,9	6,3	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	30	30	31	6	3	100	122
2	F	3,8	6,0	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	36	33	24	5	2	100	104
3	F	5,4	7,0	0	131	0	869	13,1	0	5	1995	2000	29	32	25	11	3	100	127
4	M	7,8	8,0	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	33	21	29	12	5	100	135
5	M	3,4	5,7	0	125	0	875	12,5	0	7	1993	2000	27	39	25	6	3	100	119
6	F	5,0	6,5	0	121	0	879	12,1	0	1	1999	2000	31	40	17	9	3	100	113
7	F	3,5	6,0	0	129	0	871	12,9	0	0	2000	2000	35	35	20	5	5	100	110
8	M	3,7	5,5	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	26	34	27	11	2	100	129
9	M	4,6	6,5	0	134	0	866	13,4	0	5	1995	2000	31	31	29	6	3	100	119
10	M	4,3	6,0	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	35	37	20	5	3	100	104
11	F	4,3	6,5	0	129	0	871	12,9	0	5	1995	2000	33	37	21	9	0	100	106
12	F	4,0	5,5	0	135	0	865	13,5	0	11	1989	2000	42	36	15	3	4	100	91
13	M	3,8	6,5	0	123	0	877	12,3	0	5	1995	2000	29	46	20	4	1	100	102
14	F	5,1	6,5	0	131	0	869	13,1	0	5	1995	2000	36	35	21	5	3	100	104
15	M	4,5	7,0	0	123	0	877	12,3	0	3	1997	2000	31	44	16	4	5	100	108
16	F	5,5	6,5	0	130	0	870	13	0	1	1999	2000	27	43	27	3	0	100	106
17	F	5,5	6,5	0	124	0	876	12,4	0	5	1995	2000	33	45	22	0	0	100	89
18	F	3,8	5,0	0	124	0	876	12,4	0	15	1985	2000	28	45	14	10	3	100	115
19	F	5,9	7,0	0	119	0	881	11,9	0	1	1999	2000	35	43	12	9	1	100	98
20	F	5,6	7,0	0	125	0	875	12,5	0	1	1999	2000	29	45	17	7	2	100	108
Média		5,09	6,33	0,00	126,65	0,00	873,35	12,67	0,00	4,15	1995,85		31,8	37,6	21,6	6,5	2,6		110,45
Mediana		5,60	7,00	0,00	126,00	0,00	874,00	12,60	0,00	3,00	1997,00		31,0	37,0	21,0	6,0	3,0		108,00
des/pad		1,1	0,7	0,0	4,6	0,0	4,6	0,5	0,0	3,6	3,6	0,0	4,0	6,5	5,4	3,2	1,6	0,0	12,1



Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	7,5	7,5	0	128	0	872	12,8	0	1	1999	2000	36	30	26	4	4	100	110
2	F	3,0	6,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	34	29	23	12	2	100	119
3	F	5,1	6,5	0	111	0	889	11,1	0	2	1998	2000	36	26	18	15	5	100	127
4	M	7,0	7,5	0	121	0	879	12,1	0	3	1997	2000	28	34	25	9	4	100	127
5	M	4,1	6,0	0	137	0	863	13,7	0	2	1998	2000	34	36	17	11	2	100	111
6	M	7,1	7,5	0	120	0	880	12	0	1	1999	2000	36	40	12	9	3	100	103
7	F	6,5	7,0	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	38	35	16	6	5	100	105
8	F	4,6	6,5	0	139	0	861	13,9	0	4	1996	2000	25	34	29	8	4	100	132
9	F	7,5	7,5	0	121	0	879	12,1	0	5	1995	2000	26	39	28	4	3	100	119
10	M	5,3	7,0	0	124	0	876	12,4	0	2	1998	2000	39	40	12	6	3	100	94
11	F	4,8	6,5	0	132	0	868	13,2	0	3	1997	2000	45	37	11	6	1	100	81
12	F	5,2	6,5	0	121	0	879	12,1	0	7	1993	2000	39	32	20	8	1	100	100
13	F	6,2	7,0	0	119	0	881	11,9	0	2	1998	2000	27	38	22	9	4	100	125
14	F	5,3	7,0	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	33	34	18	10	5	100	120
15	F	4,1	6,0	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	40	32	16	9	3	100	103
16	M	4,7	6,5	0	120	0	880	12	0	5	1995	2000	29	35	21	7	8	100	130
17	M	4,1	6,0	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	39	29	17	12	3	100	111
18	F	3,4	5,5	0	128	0	872	12,8	0	2	1998	2000	26	45	13	11	5	100	124
19	M	5,6	7,0	0	126	0	874	12,6	0	3	1997	2000	38	43	12	6	1	100	89
20	M	4,9	7,0	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	35	35	15	11	4	100	114
Média		5,29	6,70	0,00	125,50	0,00	874,50	12,55	0,00	2,65	1997,35		34,2	35,2	18,6	8,7	3,5		112,20
Mediana		5,15	6,75	0,00	125,00	0,00	875,00	12,50	0,00	2,00	1998,00		35,5	35,0	17,5	9,0	3,5		112,50
des/pad		1,3	0,6	0,0	6,8	0,0	6,8	0,7	0,0	1,5	1,5	0,0	5,6	4,8	5,5	2,9	1,7	0,0	14,2

CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>		Xenobionte: ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração: 6,6 µl/litro (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	14,7	9,5	0	110	0	890	11	0	4	1996	2000	33	29	28	6	4	100	119
2	F	8,8	8,0	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	31	31	24	10	4	100	125
3	F	7,2	7,2	0	113	0	887	11,3	0	3	1997	2000	30	26	23	16	5	100	140
4	M	6,1	7,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	30	37	30	1	2	100	108
5	F	4,2	6,0	0	119	0	881	11,9	0	7	1993	2000	28	38	29	4	1	100	112
6	M	4,9	6,5	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	30	39	14	13	4	100	122
7	F	10,0	8,5	0	118	0	882	11,8	0	13	1987	2000	31	37	14	12	6	100	125
8	F	11,3	9,0	0	123	0	877	12,3	0	3	1997	2000	25	34	29	8	4	100	132
9	F	4,6	6,0	0	136	0	864	13,6	0	9	1991	2000	42	41	15	2	0	100	77
10	F	3,7	5,7	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	50	30	11	7	2	100	81
11	M	10,4	9,0	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	42	37	12	8	1	100	89
12	F	5,3	7,0	0	137	0	863	13,7	0	7	1993	2000	30	32	27	10	1	100	120
13	F	11,1	9,0	0	125	0	875	12,5	0	11	1989	2000	33	37	23	6	1	100	105
14	M	4,3	6,0	0	133	0	867	13,3	0	7	1993	2000	38	31	16	8	7	100	115
15	F	4,2	6,5	0	125	0	875	12,5	0	6	1994	2000	40	23	28	4	5	100	111
16	M	6,7	7,0	0	132	0	868	13,2	0	4	1996	2000	29	34	30	6	1	100	116
17	F	9,1	8,5	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	27	33	36	3	1	100	118
18	F	7,3	7,2	0	117	0	883	11,7	0	1	1999	2000	25	36	17	13	9	100	145
19	M	7,1	8,0	0	112	0	888	11,2	0	12	1988	2000	34	43	16	6	1	100	97
20	M	10,3	8,5	0	127	0	873	12,7	0	8	1992	2000	38	39	13	6	4	100	99
Média		7,55	7,51	0,00	123,95	0,00	876,05	12,40	0,00	5,55	1994,45		33,3	34,4	21,8	7,5	3,2		112,80
Mediana		7,16	7,20	0,00	124,00	0,00	876,00	12,40	0,00	4,00	1996,00		31,0	35,0	23,0	6,5	3,0		115,50
dv pad		3,0	1,2	0,0	7,8	0,0	7,8	0,8	0,0	3,6	3,6	0,0	6,5	5,0	7,6	3,9	2,4	0,0	17,8
variança		9,2	1,4	0,0	60,2	0,0	60,2	0,6	0,0	12,8	12,8	0,0	42,0	25,4	57,9	15,5	5,9	0,0	318,3

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/litro (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1		11,3	9,0	0	126	0	874	12,6	0	5	1995	2000	41	20	29	7	3	100	111
2	M	8,3	8,0	0	121	0	879	12,1	0	1	1999	2000	37	28	15	15	3	98	115
3	M	4,3	6,5	0	118	0	882	11,8	0	2	1998	2000	27	31	20	18	4	100	141
4	F	4,9	7,0	0	119	0	881	11,9	0	9	1991	2000	31	35	29	4	1	100	109
5	F	10,8	9,0	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	36	29	25	9	1	100	110
6	F	9,5	8,5	0	119	0	881	11,9	0	0	2000	2000	39	25	27	7	2	100	108
7	F	9,1	8,0	0	130	0	870	13	1	2	1997	2000	34	33	21	12	0	100	111
8	M	4,9	7,0	0	121	0	879	12,1	0	3	1997	2000	35	41	18	5	1	100	96
9	F	9,5	8,5	0	131	0	869	13,1	0	6	1994	2000	44	40	15	1	0	100	73
10	F	4,7	6,5	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	40	33	17	8	2	100	99
11	F	4,1	6,0	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	31	25	25	17	2	100	134
12	M	3,7	6,0	0	127	0	873	12,7	0	1	1999	2000	37	39	20	2	2	100	93
13	F	4,6	6,5	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	22	42	20	14	2	100	132
14	M	3,2	6,0	0	131	0	869	13,1	0	6	1994	2000	36	33	22	7	2	100	106
15	F	6,3	7,5	0	107	0	893	10,7	0	2	1998	2000	39	29	22	9	1	100	104
16	M	5,7	7,5	0	130	0	870	13	0	5	1995	2000	33	30	15	21	1	100	127
17	M	5,2	6,8	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	29	35	33	3	0	100	110
18	F	5,0	7,0	0	116	0	884	11,6	0	2	1998	2000	36	26	23	15	0	100	117
19	M	5,1	7,0	0	131	0	869	13,1	0	9	1991	2000	28	37	15	19	1	100	128
20	M	5,6	7,0	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	25	39	28	8	0	100	119
Média		6,29	7,27	0,00	123,45	0,00	876,55	12,35	0,05	3,60	1996,35		34,0	32,5	22,0	10,1	1,4		112,15
Mediana		5,16	7,00	0,00	124,00	0,00	876,00	12,40	0,00	3,00	1997,00		35,5	33,0	21,5	8,5	1,0		110,50
des/pad		2,5	1,0	0,0	6,3	0,0	6,3	0,6	0,2	2,5	2,5	0,0	5,7	6,1	5,4	6,0	1,1	0,4	15,8

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	9,3	8,0	0	117	0	883	11,7	0	1	1999	2000	33	32	25	6	4	100	116
2	F	9,4	8,0	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	34	31	24	7	4	100	116
3	M	6,4	7,3	0	130	0	870	13	0	1	1999	2000	41	24	22	11	2	100	109
4	F	3,4	5,7	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	28	31	29	7	5	100	130
5	M	5,0	6,5	0	111	0	889	11,1	0	2	1998	2000	27	35	29	6	3	100	123
6	M	6,1	7,0	0	121	0	879	12,1	0	1	1999	2000	35	33	16	10	6	100	119
7	M	3,9	6,3	0	119	0	881	11,9	0	3	1997	2000	35	32	18	9	6	100	119
8	F	3,8	6,0	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	26	31	29	10	4	100	135
9	M	11,1	9,0	0	125	0	875	12,5	0	5	1995	2000	30	36	28	4	2	100	112
10	F	5,2	6,8	0	122	0	878	12,2	1	2	1997	2000	35	37	17	9	2	100	106
11	F	4,3	6,5	0	120	0	880	12	0	3	1997	2000	40	35	12	10	3	100	101
12	F	10,4	8,5	0	127	0	873	12,7	0	8	1992	2000	38	28	27	6	1	100	104
13	M	6,8	7,5	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	34	32	23	7	4	100	115
14	M	4,0	6,5	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	35	25	18	17	5	100	132
15	F	4,7	6,5	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	38	25	28	4	5	100	113
16	F	4,6	6,5	0	132	0	868	13,2	0	5	1995	2000	33	32	28	6	1	100	110
17	M	4,0	5,5	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	29	27	36	6	2	100	125
18	F	5,7	6,5	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	43	36	14	4	3	100	88
19	F	7,0	7,5	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	46	29	18	5	2	100	88
20	F	6,7	7,0	0	119	0	881	11,9	0	1	1999	2000	33	30	17	16	4	100	128
Média		6,09	6,96	0,00	123,90	0,00	876,10	12,39	0,05	2,70	1997,25		34,7	31,1	22,9	8,0	3,4		114,45
Mediana		5,46	6,65	0,00	123,00	0,00	877,00	12,30	0,00	2,00	1998,00		34,5	31,5	23,5	7,0	3,5		115,50
des/pad		2,3	0,9	0,0	5,6	0,0	5,6	0,6	0,2	1,7	1,7	0,0	5,3	3,8	6,4	3,6	1,5	0,0	13,0

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	6,6	7,5	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	33	35	12	16	4	100	123
2	M	8,3	8,0	0	141	0	859	14,1	0	5	1995	2000	31	37	17	10	5	100	121
3	F	8,2	8,0	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	37	41	18	4	0	100	89
4	F	5,8	7,0	0	125	0	875	12,5	0	15	1985	2000	43	39	10	5	3	100	86
5	F	7,5	7,5	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	26	47	9	10	8	100	127
6	M	3,0	6,0	0	119	0	881	11,9	0	4	1996	2000	31	45	11	8	5	100	111
7	F	4,0	6,0	0	124	0	876	12,4	0	3	1997	2000	20	44	21	10	5	100	136
8	M	6,3	7,0	0	129	0	871	12,9	0	8	1992	2000	27	37	22	12	2	100	125
9	M	3,7	5,5	0	132	0	868	13,2	0	10	1990	2000	29	45	12	10	4	100	115
10	F	7,6	8,0	0	127	0	873	12,7	0	12	1988	2000	28	42	14	7	9	100	127
11	M	2,5	5,0	0	131	0	869	13,1	0	7	1993	2000	37	41	19	1	2	100	90
12	M	5,1	6,5	0	139	0	861	13,9	0	8	1992	2000	41	29	21	8	1	100	99
13	M	5,4	6,5	0	133	0	867	13,3	0	3	1997	2000	29	33	15	20	3	100	135
14	F	3,4	6,0	0	143	0	857	14,3	0	4	1996	2000	27	51	12	7	3	100	108
15	M	5,2	6,5	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	28	39	13	9	11	100	136
16	F	5,2	7,0	0	142	0	858	14,2	0	2	1998	2000	43	30	12	11	4	100	103
17	M	5,2	6,5	0	133	0	867	13,3	0	14	1986	2000	37	41	12	7	3	100	98
18	F	3,2	6,0	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	55	39	3	2	1	100	55
19	M	4,7	6,5	0	123	0	877	12,3	0	1	1999	2000	40	31	17	9	3	100	104
20	F	3,7	6,0	0	122	0	878	12,2	0	2	1998	2000	38	37	10	9	6	100	108
Média		5,23	6,65	0,00	130,05	0,00	869,95	13,01	0,00	5,55	1994,45		34,0	39,2	14,0	8,8	4,1		109,8
Mediana		5,20	6,50	0,00	130,00	0,00	870,00	13,00	0,00	3,50	1996,50		32,0	39,0	12,5	9,0	3,5		109,5
des/pad		1,8	0,8	0,0	7,0	0,0	7,0	0,7	0,0	4,3	4,3	0,0	8,0	5,8	4,8	4,3	2,8	0,0	20,4

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	6,8	7,5	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	33	39	17	8	3	100	109
2	M	4,0	6,5	0	115	0	885	11,5	0	9	1991	2000	33	39	27	1	0	100	96
3	F	4,5	6,5	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	31	39	14	12	4	100	119
4	M	4,6	6,5	0	133	0	867	13,3	0	9	1991	2000	27	34	25	12	2	100	128
5	F	4,3	6,0	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	24	45	21	9	1	100	118
6	M	4,2	6,5	0	142	0	858	14,2	0	6	1994	2000	21	51	18	7	3	100	120
7	M	8,4	8,0	0	132	0	868	13,2	0	1	1999	2000	31	33	30	5	1	100	112
8	M	3,6	6,0	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	39	43	11	5	2	100	88
9	F	4,6	6,5	0	133	0	867	13,3	0	7	1993	2000	27	45	12	12	4	100	121
10	F	7,5	7,5	0	137	0	863	13,7	0	3	1997	2000	33	37	18	10	2	100	111
11	M	3,5	6,0	0	128	0	872	12,8	0	11	1989	2000	27	42	15	14	2	100	122
12	F	3,5	6,0	0	131	0	869	13,1	0	8	1992	2000	39	32	18	9	2	100	103
13	F	4,5	6,5	0	118	0	882	11,8	0	6	1994	2000	41	27	18	14	0	100	105
14	M	7,0	7,5	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	34	34	21	8	3	100	112
15	M	6,7	7,0	0	135	0	865	13,5	0	2	1998	2000	28	45	19	7	1	100	108
16	M	8,5	8,0	0	147	0	853	14,7	0	12	1988	2000	21	36	27	12	4	100	142
17	F	6,3	7,5	0	116	0	884	11,6	0	3	1997	2000	38	34	17	8	3	100	104
18	F	4,5	6,5	0	135	0	865	13,5	0	2	1998	2000	39	38	15	7	1	100	93
19	M	4,6	6,5	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	27	41	21	10	1	100	117
20	M	4,3	6,0	0	138	0	862	13,8	0	5	1995	2000	33	26	31	8	2	100	120
Média		5,29	6,75	0,00	129,45	0,00	870,55	12,95	0,00	5,20	1994,80		31,3	38,0	19,8	8,9	2,1		112,40
Mediana		4,54	6,50	0,00	131,00	0,00	869,00	13,10	0,00	4,00	1996,00		32,0	38,5	18,0	8,5	2,0		112,00
des/pad		1,6	0,7	0,0	8,7	0,0	8,7	0,9	0,0	3,2	3,2	0,0	6,0	6,3	5,7	3,2	1,2	0,0	12,5

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	5,4	7,0	0	131	0	869	13,1	0	7	1993	2000	26	32	25	13	4	100	137
2	M	7,7	8,0	0	120	0	880	12	0	6	1994	2000	27	34	21	15	3	100	133
3	F	5,3	7,0	0	139	0	861	13,9	0	1	1999	2000	29	29	31	7	4	100	128
4	M	4,8	6,5	0	125	0	875	12,5	0	15	1985	2000	33	36	19	7	5	100	115
5	F	9,4	8,5	0	123	0	877	12,3	0	3	1997	2000	41	26	26	5	2	100	101
6	M	4,9	7,0	0	115	0	885	11,5	0	5	1995	2000	36	33	16	12	3	100	113
7	M	7,1	8,0	0	114	0	886	11,4	0	2	1998	2000	30	35	28	6	1	100	113
8	M	10,3	8,5	0	124	0	876	12,4	0	8	1992	2000	35	26	27	7	5	100	121
9	F	4,1	6,0	0	114	0	886	11,4	0	7	1993	2000	31	26	26	12	5	100	134
10	M	6,9	7,5	0	124	0	876	12,4	0	3	1997	2000	29	35	23	11	2	100	122
11	M	6,6	7,0	0	119	0	881	11,9	0	5	1995	2000	39	26	17	15	3	100	117
12	F	11,8	9,0	1	105	0	894	10,5	0	4	1996	2000	41	29	19	5	6	100	106
13	F	3,9	6,0	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	34	39	22	3	2	100	100
14	F	4,0	6,0	0	112	0	888	11,2	0	0	2000	2000	34	22	25	16	3	100	132
15	M	4,8	6,5	0	122	0	878	12,2	0	5	1995	2000	41	34	14	8	3	100	98
16	F	5,5	6,5	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	39	31	17	11	2	100	106
17	M	7,6	9,0	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	17	41	23	15	4	100	148
18	F	7,0	7,5	0	117	0	883	11,7	0	1	1999	2000	24	45	25	4	2	100	115
19	M	6,9	7,5	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	38	38	11	7	6	100	105
20	M	6,6	7,0	0	129	0	871	12,9	0	9	1991	2000	41	26	20	11	2	100	107
Média		6,53	7,30	0,05	122,45	0,00	877,50	12,25	0,00	4,70	1995,30		33,3	32,2	21,8	9,5			117,55
Mediana		6,64	7,00	0,00	123,50	0,00	876,50	12,35	0,00	4,00	1996,00		34,0	32,5	22,5	9,5			115,00
des/pad		2,1	1,0	0,2	8,1	0,0	8,0	0,8	0,0	3,4	3,4	0,0	6,6	6,0	5,1	4,1	1,5	0,0	14,0

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/l (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	compr. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	8,5	8,0	0	134	0	866	13,4	0	4	1996	2000	35	37	18	8	2	100	105
2	M	6,3	7,5	0	118	0	882	11,8	0	7	1993	2000	31	41	23	5	0	100	102
3	M	3,0	6,0	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	29	45	12	10	4	100	115
4	F	4,0	6,0	0	129	0	871	12,9	0	11	1989	2000	20	52	19	9	0	100	117
5	F	6,3	7,0	0	123	0	877	12,3	0	3	1997	2000	24	45	21	9	1	100	118
6	F	3,7	5,5	0	137	0	863	13,7	0	5	1995	2000	21	51	18	7	3	100	120
7	M	5,4	7,0	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	30	37	27	6	0	100	109
8	F	4,3	6,5	0	125	0	875	12,5	0	5	1995	2000	37	45	11	6	1	100	89
9	F	7,3	7,2	0	129	0	871	12,9	0	9	1991	2000	31	48	9	8	4	100	106
10	M	6,1	7,0	0	126	0	874	12,6	0	7	1993	2000	43	36	16	4	1	100	84
11	M	4,2	6,0	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	43	33	15	7	2	100	92
12	F	4,9	6,5	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	32	39	18	6	5	100	113
13	M	5,3	7,0	0	121	0	879	12,1	0	9	1991	2000	42	27	23	7	1	100	98
14	F	4,1	6,0	0	138	0	862	13,8	0	1	1999	2000	34	33	27	5	1	100	106
15	F	4,6	6,0	0	135	0	865	13,5	0	12	1988	2000	37	34	19	8	2	100	104
16	M	3,7	5,7	0	143	0	857	14,3	0	2	1998	2000	35	39	20	4	2	100	99
17	F	6,9	7,5	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	38	34	18	9	1	100	101
18	F	5,3	7,0	0	129	0	871	12,9	0	7	1993	2000	33	38	17	12	0	100	108
19	F	5,8	7,0	0	139	0	861	13,9	0	2	1998	2000	35	33	21	11	0	100	108
20	F	6,5	7,0	0	133	0	867	13,3	0	3	1997	2000	42	26	22	9	1	100	101
Média		5,29	6,67	0,00	129,95	0,00	870,05	13,00	0,00	5,00	1995,00		33,6	38,7	18,7	7,5			104,75
Mediana		5,27	7,00	0,00	131,00	0,00	869,00	13,10	0,00	4,00	1996,00		34,5	37,5	18,5	7,5			105,50
des/pad		1,4	0,7	0,0	7,3	0,0	7,3	0,7	0,0	3,3	3,3	0,0	6,7	7,2	4,7	2,2	1,5	0,0	9,5



Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/litro (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	7,5	7,5	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	43	31	15	8	3	100	97
2	F	3,5	6,0	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	33	39	27	1	0	100	96
3	F	5,3	7,0	0	135	0	865	13,5	0	2	1998	2000	31	39	14	12	4	100	119
4	M	4,8	6,5	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	35	33	18	12	2	100	113
5	F	6,4	7,5	0	121	0	879	12,1	0	0	2000	2000	24	45	21	9	1	100	118
6	F	7,2	7,5	0	126	0	874	12,6	0	4	1996	2000	21	51	18	7	3	100	120
7	F	4,5	6,5	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	41	33	20	5	1	100	92
8	M	6,5	7,5	0	113	0	887	11,3	0	5	1995	2000	29	42	11	16	2	100	120
9	F	5,7	7,5	0	122	0	878	12,2	0	8	1992	2000	43	29	12	12	4	100	105
10	M	6,2	7,5	0	121	0	879	12,1	0	3	1997	2000	31	37	18	12	2	100	117
11	F	3,4	5,5	0	126	0	874	12,6	1	7	1992	2000	27	42	15	14	2	100	122
12	M	5,6	7,0	0	132	0	868	13,2	0	6	1994	2000	36	33	18	11	2	100	110
13	M	8,1	8,0	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	41	27	18	14	0	100	105
14	F	3,6	6,0	0	136	0	864	13,6	0	4	1996	2000	43	29	17	8	3	100	99
15	M	5,0	6,5	0	138	0	862	13,8	0	1	1999	2000	29	36	19	11	5	100	127
16	F	6,1	7,0	0	142	0	858	14,2	0	7	1993	2000	31	36	17	12	4	100	122
17	F	8,3	8,0	0	138	0	862	13,8	0	11	1989	2000	38	34	17	8	3	100	104
18	M	4,3	6,5	0	122	0	878	12,2	0	5	1995	2000	33	38	15	14	0	100	110
19	M	4,1	6,0	0	133	0	867	13,3	0	3	1997	2000	41	31	17	10	1	100	99
20	F	6,9	7,5	0	141	0	859	14,1	0	6	1994	2000	33	26	31	8	2	100	120
Média		5,64	6,95	0,00	129,25	0,00	870,75	12,93	0,05	4,25	1995,70		34,2	35,6	17,9	10,2	2,2		110,8
Mediana		5,67	7,00	0,00	130,00	0,00	870,00	13,00	0,00	4,00	1996,00		33,0	35,0	17,5	11,0	2,0		111,5
des/pad		1,5	0,7	0,0	7,9	0,0	7,9	0,8	0,2	2,7	2,8	0,0	6,5	6,3	4,6	3,5	1,4	0,0	10,5

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/l (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	4,7	6,5	0	132	0	868	13,2	0	5	1995	2000	40	34	15	9	2	100	99
2	M	4,1	6,0	0	127	0	873	12,7	0	4	1996	2000	31	33	23	10	3	100	121
3	F	7,5	8,0	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	48	32	14	5	1	100	79
4	M	5,3	7,0	0	113	0	887	11,3	0	4	1996	2000	29	41	14	12	4	100	121
5	M	4,8	6,5	0	134	0	866	13,4	0	3	1997	2000	37	30	22	10	1	100	108
6	F	9,4	8,5	0	118	0	882	11,8	0	1	1999	2000	33	42	15	7	3	100	105
7	M	3,5	5,7	0	122	0	878	12,2	0	3	1997	2000	38	30	24	7	1	100	103
8	M	5,0	6,5	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	42	27	12	14	5	100	113
9	M	6,0	7,0	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	31	33	19	12	5	100	127
10	M	4,3	6,0	0	127	0	873	12,7	0	13	1987	2000	43	33	17	5	2	100	90
11	F	4,2	6,5	0	139	0	861	13,9	0	8	1992	2000	47	22	17	11	3	100	101
12	F	8,4	8,0	0	152	0	848	15,2	0	4	1996	2000	33	29	21	10	7	100	129
13	F	7,0	8,0	0	133	0	867	13,3	0	3	1997	2000	26	32	21	19	2	100	139
14	M	5,2	6,5	0	141	0	859	14,1	0	10	1990	2000	42	27	22	6	3	100	101
15	M	5,2	7,0	0	131	0	869	13,1	0	6	1994	2000	38	27	18	14	3	100	117
16	M	7,1	7,2	0	133	0	867	13,3	0	8	1992	2000	43	26	18	11	2	100	103
17	F	6,3	7,0	0	131	0	869	13,1	0	4	1996	2000	40	27	19	10	4	100	111
18	F	4,5	6,0	0	117	0	883	11,7	0	4	1996	2000	39	25	19	10	7	100	121
19	M	4,6	6,5	0	122	0	878	12,2	0	1	1999	2000	44	27	17	6	6	100	103
20	M	4,3	6,0	0	129	0	871	12,9	0	0	2000	2000	32	33	14	19	2	100	126
Média		5,53	6,82	0,00	129,35	0,00	870,65	12,94	0,00	4,30	1995,70		37,8	30,5	18,1	10,4	3,3		110,85
Mediana		5,00	6,50	0,00	130,00	0,00	870,00	13,00	0,00	4,00	1996,00		38,5	30,0	18,0	10,0	3,0		109,5
des/pad		1,6	0,8	0,0	8,9	0,0	8,9	0,9	0,0	3,3	3,3	0,0	6,1	5,0	3,4	4,0	1,9	0,0	14,5

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (E)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	4,0	6,0	0	131	0	869	13,1	0	15	1985	2000	27	33	21	14	5	100	137
2	F	6,4	7,5	0	121	0	879	12,1	0	9	1991	2000	23	42	17	13	5	100	135
3	M	7,2	7,5	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	45	28	18	6	3	100	94
4	M	3,8	5,0	0	119	0	881	11,9	0	9	1991	2000	35	30	23	7	5	100	117
5	F	5,9	7,0	0	115	0	885	11,5	0	3	1997	2000	52	29	9	5	5	100	82
6	M	9,1	8,5	0	114	0	886	11,4	0	3	1997	2000	34	30	20	10	6	100	124
7	F	4,6	6,5	0	123	0	877	12,3	0	4	1996	2000	33	32	16	12	7	100	128
8	F	3,2	6,0	0	117	0	883	11,7	0	4	1996	2000	42	26	18	8	6	100	110
9	F	9,3	8,5	0	129	0	871	12,9	0	5	1995	2000	46	21	18	8	7	100	109
10	M	3,4	5,5	0	136	0	864	13,6	0	6	1994	2000	27	33	17	12	11	100	147
11	M	5,6	7,0	0	132	0	868	13,2	0	3	1997	2000	32	33	17	11	7	100	128
12	F	8,3	8,0	0	125	0	875	12,5	0	15	1985	2000	41	20	20	11	8	100	125
13	M	6,5	7,5	0	117	0	883	11,7	0	6	1994	2000	37	34	20	5	4	100	105
14	F	7,0	7,5	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	32	36	19	6	7	100	120
15	M	5,4	6,0	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	41	28	22	7	2	100	101
16	M	5,9	7,0	0	111	0	889	11,1	0	1	1999	2000	46	29	16	6	3	100	91
17	M	8,9	8,5	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	42	27	19	9	3	100	104
18	F	4,8	6,5	0	116	0	884	11,6	0	1	1999	2000	44	32	18	4	2	100	88
19	F	4,2	6,0	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	34	34	27	3	2	100	105
20	F	3,9	5,5	0	134	0	866	13,4	0	4	1996	2000	38	30	19	10	3	100	110
Média		5,87	6,88	0,00	123,65	0,00	876,35	12,37	0,00	5,05	1994,95		37,6	30,4	18,7	8,4	5,1		113,00
Mediana		5,76	7,00	0,00	124,00	0,00	876,00	12,40	0,00	4,00	1996,00		37,5	30,0	18,5	8,0	5,0		110,00
des/pad		1,9	1,1	0,0	7,2	0,0	7,2	0,7	0,0	4,1	4,1	0,0	7,5	4,9	3,5	3,2	2,4	0,0	17,5

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (F)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocr		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	4,4	6,5	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	38	31	17	9	5	100	127
2	F	4,5	6,5	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	35	33	15	8	9	100	132
3	M	6,5	7,5	0	122	0	878	12,2	0	7	1993	2000	40	34	17	6	3	100	115
4	M	6,4	7,0	0	117	0	883	11,7	0	9	1991	2000	39	29	18	10	4	100	129
5	M	9,2	8,5	0	121	0	879	12,1	0	11	1989	2000	35	30	18	12	5	100	133
6	F	6,4	7,5	0	135	0	865	13,5	0	6	1994	2000	49	28	12	7	4	100	115
7	F	5,7	7,5	0	121	0	879	12,1	0	11	1989	2000	38	33	19	7	3	100	121
8	M	6,2	7,5	0	101	0	899	10,1	0	9	1991	2000	41	29	19	6	5	100	130
9	M	9,1	8,5	0	123	0	877	12,3	0	3	1997	2000	36	27	19	15	3	100	135
10	F	5,1	7,0	0	128	0	872	12,8	0	6	1994	2000	43	31	11	7	8	100	122
11	M	5,6	7,0	0	124	0	876	12,4	0	11	1989	2000	43	30	20	4	3	100	123
12	M	8,4	8,5	0	121	0	879	12,1	0	6	1994	2000	43	23	16	14	4	100	135
13	F	5,0	6,5	0	127	0	873	12,7	0	3	1997	2000	41	34	12	7	6	100	115
14	M	6,1	7,0	0	139	0	861	13,9	0	1	1999	2000	48	22	19	8	3	100	133
15	M	4,8	6,5	0	123	0	877	12,3	0	14	1986	2000	40	30	19	6	5	100	129
16	F	6,5	7,5	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	45	23	13	12	7	100	136
17	M	4,0	6,5	0	115	0	885	11,5	0	9	1991	2000	49	30	12	6	3	100	109
18	M	4,5	6,5	0	123	0	877	12,3	0	13	1987	2000	36	33	16	9	6	100	126
19	M	6,4	7,0	0	121	0	879	12,1	0	3	1997	2000	39	34	21	3	3	100	120
20	M	4,8	6,5	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	36	30	17	11	6	100	133
Média		5,98	7,18	0,00	122,80	0,00	877,20	12,28	0,00	6,60	1993,40		29,7	40,7	8,4	16,5			125,90
Mediana		5,91	7,00	0,00	122,50	0,00	877,50	12,25	0,00	6,00	1994,00		30,0	40,0	7,5	17,0			128,00
des/pad		1,5	0,7	0,0	8,0	0,0	8,0	0,8	0,0	4,1	4,1	0,0	4,5	3,6	3,0	3,2	1,8	0,0	8,0

Espécie:	CARPA - <i>Cyprinus carpio</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (E)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	6,4	7,0	0	115	0	885	11,5	0	2	1998	2000	23	33	19	16	9	100	155
2	F	9,3	8,0	0	135	0	865	13,5	0	4	1996	2000	18	26	34	15	7	100	167
3	F	7,9	8,0	0	118	0	882	11,8	1	4	1995	2000	45	33	17	4	1	100	83
4	M	4,5	7,0	0	119	0	881	11,9	0	12	1988	2000	34	33	11	15	7	100	128
5	F	5,8	7,0	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	39	24	17	18	2	100	120
6	F	5,5	6,5	0	124	0	876	12,4	0	4	1996	2000	34	25	20	12	9	100	137
7	F	7,2	7,5	0	122	0	878	12,2	0	15	1985	2000	28	25	23	15	9	100	152
8	M	6,8	7,5	0	117	0	883	11,7	0	2	1998	2000	38	25	20	11	6	100	122
9	M	3,8	6,0	0	133	0	867	13,3	0	6	1994	2000	39	19	16	14	3	91	105
10	M	6,5	7,0	0	128	0	872	12,8	0	9	1991	2000	39	31	16	9	5	100	110
11	F	4,0	6,0	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	29	29	19	14	9	100	145
12	M	6,3	7,0	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	43	22	14	13	8	100	121
13	F	4,7	6,5	0	127	0	873	12,7	0	7	1993	2000	31	33	13	15	8	100	136
14	F	4,1	6,0	0	117	0	883	11,7	0	4	1996	2000	31	38	19	7	5	100	117
15	M	5,2	6,5	0	121	0	879	12,1	0	5	1995	2000	35	26	16	14	9	100	136
16	F	5,2	7,0	0	119	0	881	11,9	0	6	1994	2000	29	26	24	14	7	100	144
17	M	4,6	6,5	0	122	0	878	12,2	0	17	1983	2000	36	24	16	13	11	100	139
18	M	3,2	6,0	0	119	0	881	11,9	0	4	1996	2000	34	26	18	10	4	92	108
19	M	5,1	7,0	0	127	0	873	12,7	0	7	1993	2000	35	33	19	10	3	100	113
20	M	5,6	7,0	0	134	0	866	13,4	0	1	1999	2000	38	24	16	13	9	100	131
Média		5,57	6,85	0,00	123,45	0,00	876,55	12,35	0,05	5,85	1994,10		33,9	27,8	18,4	12,6	6,6		128,45
Mediana		5,33	7,00	0,00	122,00	0,00	878,00	12,20	0,00	4,00	1995,50		34,5	26,0	17,5	13,5	7,0		129,50
des/pad		1,5	0,6	0,0	5,9	0,0	5,9	0,6	0,2	4,4	4,4	0,0	6,5	4,8	4,8	3,3	2,8	2,6	19,8

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	CONTROLE
Tempo e modo de exposição	CONTROLE	Concentração:	

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	2,20	4,50	0	130	0	870	13	0	4	1996	2000	45	40	5	8	2	100	82
2	F	14,40	8,50	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	37	47	10	6	0	100	85
3	M	9,30	8,00	0	117	0	883	11,7	0	3	1997	2000	45	37	12	4	2	100	81
4	F	5,60	6,00	0	137	0	863	13,7	0	4	1996	2000	47	34	11	5	3	100	83
5	F	4,60	6,00	0	145	0	855	14,5	0	7	1993	2000	49	30	9	11	1	100	85
6	F	8,90	8,00	0	147	0	853	14,7	0	5	1995	2000	45	35	12	6	2	100	85
7	M	4,90	6,00	0	119	0	881	11,9	0	8	1992	2000	45	36	11	8	0	100	82
8	F	10,30	8,00	0	136	0	864	13,6	0	9	1991	2000	44	37	11	6	2	100	85
9	F	8,70	7,50	0	144	0	856	14,4	0	5	1995	2000	44	36	9	9	2	100	89
10	M	2,00	4,00	0	136	0	864	13,6	0	4	1996	2000	45	35	12	8	0	100	83
11	F	3,70	5,30	0	154	0	846	15,4	0	3	1997	2000	45	33	12	9	1	100	88
12	M	8,50	7,80	0	133	0	867	13,3	0	3	1997	2000	47	36	6	8	3	100	84
13	M	7,35	7,00	0	146	0	854	14,6	0	2	1998	2000	53	23	12	7	5	100	88
14	F	6,70	5,10	0	132	0	868	13,2	0	4	1996	2000	40	40	15	4	1	100	86
15	M	4,30	5,50	0	147	0	853	14,7	0	6	1994	2000	41	39	13	5	2	100	88
16	M	8,70	7,90	0	128	0	872	12,8	0	5	1995	2000	51	27	12	6	4	100	85
17	F	6,80	6,90	0	145	0	855	14,5	0	3	1997	2000	54	19	18	8	1	100	83
18	F	5,90	6,30	0	119	0	881	11,9	0	4	1996	2000	54	22	13	8	3	100	84
19	M	7,10	7,20	0	133	0	867	13,3	0	1	1999	2000	49	29	12	8	2	100	85
20	M	7,20	7,20	0	139	0	861	13,9	0	0	2000	2000	53	25	10	9	3	100	84
Média		6,86	6,64	0,00	135,65	0,00	864,35	13,57	0,00	4,10	1995,90		46,7	33,0	11,3	7,2	2,0		84,75
Mediana		6,95	6,95	0,00	136,00	0,00	864,00	13,60	0,00	4,00	1996,00		45,0	35,0	12,0	8,0	2,0		85,00
des/pad		2,9	1,3	0,0	10,4	0,0	10,4	1,0	0,0	2,2	2,2	0,0	4,7	7,0	2,8	1,8	1,3	0,0	2,2

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	2,00	4,30	0	131	0	869	13,1	0	12	1988	2000	45	30	18	4	3	100	90
2	F	2,60	4,80	0	107	0	893	10,7	0	4	1996	2000	52	24	15	5	4	100	85
3	F	4,30	6,00	0	127	0	873	12,7	0	8	1992	2000	55	17	15	10	3	100	89
4	M	4,20	5,50	0	135	0	865	13,5	0	7	1993	2000	48	31	13	6	2	100	83
5	F	3,40	5,00	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	43	34	15	7	1	100	89
6	M	2,45	5,00	0	144	0	856	14,4	0	4	1996	2000	51	26	10	9	4	100	89
7	F	2,80	5,10	0	179	0	821	17,9	0	5	1995	2000	48	32	11	6	3	100	84
8	F	2,30	4,90	0	118	0	882	11,8	0	4	1996	2000	47	25	15	9	4	100	98
9	M	2,60	5,50	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	46	30	16	7	1	100	87
10	M	2,20	4,50	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	45	31	12	10	2	100	93
11	M	1,90	4,50	0	124	0	876	12,4	0	6	1994	2000	43	36	11	9	1	100	89
12	F	1,60	4,50	0	135	0	865	13,5	0	0	2000	2000	51	21	16	11	1	100	90
13	F	2,90	4,70	0	127	0	873	12,7	0	7	1993	2000	45	31	19	4	1	100	85
14	F	4,00	5,80	0	124	0	876	12,4	0	2	1998	2000	53	23	14	8	2	100	83
15	M	2,70	5,00	0	156	0	844	15,6	0	9	1991	2000	48	34	9	4	5	100	84
16	M	5,90	6,80	0	129	0	871	12,9	0	9	1991	2000	45	29	22	2	2	100	87
17	F	2,70	4,80	0	134	0	866	13,4	0	0	2000	2000	44	29	24	3	0	100	86
18	F	2,40	4,00	0	115	0	885	11,5	0	6	1994	2000	55	20	14	7	4	100	85
19	M	2,34	5,40	0	115	0	885	11,5	0	1	1999	2000	44	37	13	5	1	100	82
20	F	2,90	6,00	0	129	0	871	12,9	0	4	1996	2000	38	45	13	2	2	100	85
Média		2,91	5,11	0,00	131,15	0,00	868,85	13,12	0,00	4,75	1995,25		47,3	29,3	14,8	6,4	2,3		87,15
Mediana		2,65	5,00	0,00	129,00	0,00	871,00	12,90	0,00	4,00	1996,00		46,5	30,0	14,5	6,5	2,0		86,50
des/pad		1,0	0,7	0,0	15,5	0,0	15,5	1,6	0,0	3,2	3,2	0,0	4,4	6,6	3,8	2,7	1,4	0,0	3,9

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	5,07	6,50	0	115	0	885	11,5	0	8	1992	2000	47	31	13	6	3	100	87
2	M	2,60	5,00	0	128	0	872	12,8	0	3	1997	2000	50	25	14	9	2	100	88
3	F	3,73	5,50	0	137	0	863	13,7	0	12	1988	2000	54	22	11	8	5	100	88
4	F	4,82	6,60	0	135	0	865	13,5	0	5	1995	2000	49	27	16	3	5	100	88
5	M	3,34	5,50	0	119	0	881	11,9	0	6	1994	2000	48	27	16	6	3	100	89
6	F	3,00	5,30	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	47	33	10	6	4	100	87
7	F	5,86	7,00	0	123	0	877	12,3	0	9	1991	2000	48	27	17	5	3	100	88
8	F	4,74	5,50	0	120	0	880	12	0	1	1999	2000	51	27	11	8	3	100	85
9	F	4,90	6,00	0	137	0	863	13,7	0	5	1995	2000	53	22	16	6	3	100	84
10	M	6,88	7,00	0	125	0	875	12,5	0	4	1996	2000	47	31	11	10	1	100	87
11	M	5,72	7,00	0	128	0	872	12,8	0	7	1993	2000	44	36	12	8	0	100	84
12	F	2,75	4,70	0	145	0	855	14,5	0	2	1998	2000	41	37	18	3	1	100	86
13	M	6,5	6,90	0	138	0	862	13,8	0	5	1995	2000	44	34	17	4	1	100	84
14	M	4,10	6,20	0	137	0	863	13,7	0	2	1998	2000	54	23	11	7	5	100	86
15	F	4,50	6,40	0	124	0	876	12,4	0	6	1994	2000	47	33	12	4	4	100	85
16	M	4,00	5,90	0	129	0	871	12,9	0	4	1996	2000	44	33	20	3	0	100	82
17	F	5,50	6,80	0	133	0	867	13,3	0	0	2000	2000	33	44	20	3	0	100	93
18	F	6,20	6,50	0	144	0	856	14,4	0	5	1995	2000	43	31	14	10	2	100	97
19																			
20																			
Média		4,57	6,13	0,00	130,33	0,00	869,67	13,03	0,00	4,83	1995,17		46,9	30,2	14,4	6,1	2,5		87,11
Mediana		4,74	6,30	0,00	129,00	0,00	871,00	12,90	0,00	5,00	1995,00		47,0	31,0	14,0	6,0	3,0		87,00
des/pad		1,2	0,7	0,0	8,5	0,0	8,5	0,9	0,0	3,0	3,0	0,0	5,1	5,8	3,2	2,4	1,7	0,0	3,5



Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	3,3 µl/l (1,58 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	2,62	4,50	0	110	0	890	11	0	0	2000	2000	49	30	13	4	4	100	84
2	F	5,74	6,50	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	46	29	14	9	2	100	92
3	F	3,26	5,30	0	133	0	867	13,3	0	8	1992	2000	50	20	18	7	5	100	97
4	M	3,00	5,00	0	127	0	873	12,7	0	9	1991	2000	38	44	15	1	2	100	85
5	F	2,45	5,50	0	112	0	888	11,2	0	114	1886	2000	42	45	11	2	0	100	73
6	M	2,45	5,90	0	130	0	870	13	0	4	1996	2000	46	26	12	9	3	96	89
7	F	2,20	4,50	0	134	0	866	13,4	0	6	1994	2000	39	31	18	3	3	94	88
8	F	1,80	4,00	0	135	0	865	13,5	0	4	1996	2000	49	19	16	8	4	96	91
9	M	1,80	4,00	0	145	0	855	14,5	0	3	1997	2000	36	42	21	1	0	100	87
10	M	2,18	4,50	0	123	0	877	12,3	0	12	1988	2000	39	40	12	6	3	100	94
11	M	2,25	4,50	0	126	0	874	12,6	0	6	1994	2000	45	37	11	6	1	100	81
12	F	2,30	3,90	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	45	32	14	8	1	100	88
13	F	3,00	4,80	0	113	0	887	11,3	0	7	1993	2000	36	46	14	4	0	100	86
14	F	4,00	5,80	0	120	0	880	12	0	2	1998	2000	43	34	11	7	5	100	97
15	M	2,50	4,80	0	119	0	881	11,9	0	11	1989	2000	40	35	16	4	5	100	99
16	M	5,90	6,80	0	133	0	867	13,3	0	9	1991	2000	34	45	19	1	1	100	90
17	F	2,70	4,80	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	35	47	17	1	0	100	84
18	F	2,60	4,10	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	50	26	12	7	5	100	91
19	M	2,40	5,40	0	131	0	869	13,1	0	1	1999	2000	38	43	12	6	1	100	89
20	F	2,90	6,00	0	156	0	844	15,6	0	4	1996	2000	40	45	15	0	0	100	75
Média		2,90	5,03	0,00	128,20	0,00	871,80	12,82	0,00	10,45	1989,55		42,0	35,8	14,6	4,7	2,3		88,00
Mediana		2,55	4,80	0,00	128,50	0,00	871,50	12,85	0,00	4,00	1996,00		41,0	36,0	14,0	5,0	2,0		88,50
des/pad		1,1	0,8	0,0	11,0	0,0	11,0	1,1	0,0	24,6	24,6	0,0	5,2	8,9	2,9	3,0	1,9	1,8	6,7

LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>		Xenobionte: ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração: 6,6 µl/litro (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	9,17	7,50	0	145	0	855	14,5	0	16	1984	2000	50	27	17	4	2	100	81
2	M	6,27	6,50	0	142	0	858	14,2	0	2	1998	2000	46	32	14	4	4	100	88
3	F	3,57	5,30	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	49	24	18	6	3	100	90
4	F	6,07	7,50	0	100	0	900	10	0	1	1999	2000	43	34	22	1	0	100	81
5	M	3,40	5,00	0	133	0	867	13,3	0	3	1997	2000	34	40	21	4	1	100	98
6	F	5,00	6,50	0	144	0	856	14,4	0	8	1992	2000	45	33	14	5	3	100	88
7	F	2,75	5,00	0	116	0	884	11,6	0	4	1996	2000	47	37	9	4	3	100	79
8	M	5,43	6,50	0	119	0	881	11,9	0	3	1997	2000	43	34	11	8	4	100	96
9	F	7,16	7,50	0	127	0	873	12,7	0	5	1995	2000	42	36	15	2	5	100	92
10	F	5,54	6,50	0	132	0	868	13,2	0	7	1993	2000	46	28	11	11	4	100	99
11	M	3,73	6,00	0	122	0	878	12,2	0	9	1991	2000	43	37	12	7	1	100	86
12	F	1,77	4,00	0	107	0	893	10,7	0	2	1998	2000	45	26	21	7	1	100	93
13	F	4,00	6,20	0	104	0	896	10,4	0	12	1988	2000	38	37	16	6	3	100	99
14	F	3,50	5,30	0	136	0	864	13,6	0	2	1998	2000	49	23	16	7	5	100	96
15	M	5,50	6,50	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	47	22	23	4	4	100	96
16	F	6,00	6,30	0	112	0	888	11,2	0	3	1997	2000	42	30	18	9	1	100	97
17	M	8,78	7,00	0	141	0	859	14,1	0	4	1996	2000	44	31	21	3	1	100	86
18	M	2,30	4,30	0	144	0	856	14,4	0	4	1996	2000	54	19	15	7	5	100	90
19	F	5,40	6,40	0	128	0	872	12,8	0	2	1998	2000	56	21	11	10	2	100	81
20	M	4,90	6,00	0	132	0	868	13,2	0	5	1995	2000	51	28	13	6	2	100	80
Média		5,01	6,09	0,00	126,75	0,00	873,25	12,68	0,00	4,85	1995,15		45,7	30,0	15,9	5,8	2,7		89,80
Mediana		5,2	6,35	0,00	127,50	0,00	872,50	12,75	0,00	3,50	1996,50		45,5	30,5	15,5	6,0	3,0		90,00
des/pad		2,0	1,0	0,0	13,7	0,0	13,7	1,4	0,0	3,8	3,8	0,0	5,1	6,1	4,2	2,6	1,6	0,0	6,9

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/litro (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	5,44	6,50	0	102	0	898	10,2	0	2	1998	2000	52	22	19	7	0	100	81
2	F	4,20	6,50	0	132	0	868	13,2	0	8	1992	2000	48	28	15	6	3	100	88
3	F	3,00	5,00	0	125	0	875	12,5	0	11	1989	2000	47	32	9	8	4	100	90
4	M	2,50	5,00	0	129	0	871	12,9	0	3	1997	2000	45	35	15	4	1	100	81
5	F	4,50	6,00	0	145	0	855	14,5	0	3	1997	2000	42	29	19	9	1	100	98
6	M	4,92	6,00	0	119	0	881	11,9	0	4	1996	2000	49	25	17	7	2	100	88
7	F	8,10	7,30	0	127	0	873	12,7	1	4	1995	2000	46	32	19	3	0	100	79
8	M	4,75	5,40	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	35	41	18	5	1	100	96
9	F	5,50	6,50	0	125	0	875	12,5	0	5	1995	2000	42	35	15	5	3	100	92
10	M	5,65	6,30	0	118	0	882	11,8	0	2	1998	2000	40	33	17	8	2	100	99
11	F	6,63	7,50	0	131	0	869	13,1	0	5	1995	2000	52	25	10	11	2	100	86
12	M	6,50	6,9	0	125	0	875	12,5	0	6	1994	2000	37	39	20	2	2	100	93
13	M	7,83	8,50	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	35	42	14	7	2	100	99
14	F	8,30	7,50	0	121	0	879	12,1	0	10	1990	2000	41	33	17	7	2	100	96
15	F	6,40	7,50	0	125	0	875	12,5	0	2	1998	2000	43	29	18	9	1	100	96
16	M	5,80	7,00	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	43	30	15	11	1	100	97
17	M	3,80	6,00	0	120	0	880	12	0	7	1993	2000	41	35	21	3	0	100	86
18	F	4,07	6,00	0	125	0	875	12,5	0	4	1996	2000	46	27	18	9	0	100	90
19	F	3,73	5,90	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	43	38	15	3	1	100	81
20	F	5,60	6,70	0	123	0	877	12,3	0	6	1994	2000	35	44	14	4	3	100	96
Média		5,45	6,48	0,00	125,40	0,00	874,60	12,54	0,05	4,70	1995,25		43,1	32,7	16,3	6,4	1,6		90,60
Mediana		5,5	6,50	0,00	125,00	0,00	875,00	12,50	0,00	4,00	1996,00		43,0	32,5	17,0	7,0	1,5		91,00
des/pad		1,6	0,9	0,0	8,4	0,0	8,4	0,8	0,2	2,6	2,6	0,0	5,2	6,0	3,1	2,7	1,1	0,0	6,6

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	ROUNDUP
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (3,16 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	3,07	5,00	0	131	0	869	13,1	0	7	1993	2000	37	36	21	4	2	100	98
2	F	4,44	6,50	0	141	0	859	14,1	0	6	1994	2000	43	37	12	4	4	100	89
3	M	7,66	7,00	0	112	0	888	11,2	0	11	1989	2000	46	24	22	8	0	100	92
4	M	5,53	6,50	0	106	0	894	10,6	0	0	2000	2000	53	26	11	8	2	100	80
5	M	6,77	6,50	0	134	0	866	13,4	0	3	1997	2000	49	22	23	3	3	100	89
6	M	8,06	7,50	0	111	0	889	11,1	0	7	1993	2000	48	28	11	9	4	100	93
7	M	3,78	6,00	0	112	0	888	11,2	0	9	1991	2000	44	30	18	7	1	100	91
8	F	4,98	6,00	0	124	0	876	12,4	0	7	1993	2000	45	31	10	10	4	100	97
9	M	2,84	5,00	0	123	0	877	12,3	0	3	1997	2000	42	32	16	8	2	100	96
10	F	3,12	5,00	0	131	0	869	13,1	0	6	1994	2000	50	26	13	9	2	100	87
11	M	2,24	5,00	0	106	0	894	10,6	0	5	1995	2000	62	13	12	10	3	100	79
12	M	1,97	4,50	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	34	43	15	7	1	100	98
13	M	7,50	7,10	0	127	0	873	12,7	0	0	2000	2000	49	27	17	4	3	100	85
14	F	6,80	6,90	0	136	0	864	13,6	0	9	1991	2000	45	28	18	5	4	100	95
15	F	4,90	6,80	0	145	0	855	14,5	0	5	1995	2000	50	25	16	4	5	100	89
16	F	5,70	6,60	0	144	0	856	14,4	0	1	1999	2000	44	32	17	6	1	100	88
17	M	4,90	6,50	0	112	0	888	11,2	0	2	1998	2000	47	28	21	3	1	100	83
18													47	33	13	6	1	100	81
19													45	27	18	6	4	100	97
20													47	31	12	8	2	100	87
Média		4,96	6,14	0,00	125,29	0,00	874,71	12,53	0,00	4,94	1995,06		46,4	29,0	15,8	6,5	2,5		89,70
Mediana		4,9	6,50	0,00	127,00	0,00	873,00	12,70	0,00	5,00	1995,00		46,5	28,0	16,0	6,5	2,0		89,00
des/pad		1,9	0,9	0,0	13,3	0,0	13,3	1,3	0,0	3,2	3,2	0,0	5,7	6,2	4,0	2,3	1,4	0,0	6,1

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	9,33	8,00	0	145	0	855	14,5	0	10	1990	2000	33	35	12	16	4	100	123
2	F	9,15	7,00	0	131	0	869	13,1	0	12	1988	2000	31	37	17	10	5	100	121
3	F	6,62	7,50	0	107	0	893	10,7	0	9	1991	2000	37	41	18	4	0	100	89
4	M	4,41	5,50	0	112	0	888	11,2	0	2	1998	2000	43	39	10	5	3	100	86
5	F	3,60	5,10	0	132	0	868	13,2	0	2	1998	2000	44	42	8	4	2	100	78
6	F	3,30	6,00	0	119	0	881	11,9	0	3	1997	2000	31	45	11	8	5	100	111
7	M	4,85	6,50	0	129	0	871	12,9	0	8	1992	2000	20	44	21	10	5	100	136
8	F	3,40	5,50	0	136	0	864	13,6	0	17	1983	2000	27	37	22	12	2	100	125
9	F	7,96	7,50	0	123	0	877	12,3	0	11	1989	2000	40	40	15	5	0	100	85
10	F	3,50	5,50	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	35	39	12	6	8	100	113
11	F	9,50	8,30	0	131	0	869	13,1	0	8	1992	2000	37	41	19	1	2	100	90
12	M	7,00	6,50	0	160	0	840	16	0	7	1993	2000	41	29	21	8	1	100	99
13	M	6,70	5,80	0	134	0	866	13,4	0	12	1988	2000	55	26	11	5	3	100	75
14	F	6,90	5,70	0	128	0	872	12,8	0	16	1984	2000	36	51	10	2	1	100	81
15	M	5,80	4,80	0	123	0	877	12,3	0	5	1995	2000	43	48	4	5	0	100	71
16	M	5,50	4,60	0	112	0	888	11,2	0	15	1985	2000	34	35	15	12	4	100	117
17	M	4,80	5,50	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	37	41	12	7	3	100	98
18	M	5,80	5,30	0	145	0	855	14,5	0	2	1998	2000	55	39	3	2	1	100	55
19	F	6,10	6,00	0	109	0	891	10,9	0	4	1996	2000	40	31	17	9	3	100	104
20	F	7,12	6,80	0	126	0	874	12,6	0	5	1995	2000	38	37	10	9	6	100	108
Média		6,07	6,24	0,00	128,00	0,00	872,00	12,80	0,00	7,65	1992,35		37,9	38,9	13,4	7,0	2,9		98,25
Mediana		5,95	6,00	0,00	128,50	0,00	871,50	12,85	0,00	7,50	1992,50		37,0	39,0	12,0	6,5	3,0		98,50
des/pad		2,0	1,0	0,0	13,0	0,0	13,0	1,3	0,0	5,0	5,0	0,0	8,2	6,0	5,4	3,8	2,2	0,0	21,1

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	9,07	7,50	1	100	0	899	10	1	12	1987	2000	49	26	12	12	1	100	90
2	M	4,03	6,00	0	125	0	875	12,5	0	7	1993	2000	38	37	16	7	2	100	98
3	M	5,65	6,50	0	145	0	855	14,5	0	19	1981	2000	30	40	21	9	0	100	109
4	F	6,65	7,50	0	133	0	867	13,3	0	31	1969	2000	38	39	14	6	3	100	97
5	F	8,40	7,50	0	147	0	853	14,7	0	5	1995	2000	37	46	13	3	1	100	85
6	F	7,85	8,70	0	121	0	879	12,1	0	8	1992	2000	49	30	10	7	4	100	87
7	M	4,38	6,50	0	151	0	849	15,1	0	6	1994	2000	41	34	14	6	5	100	100
8	M	8,82	8,00	0	125	0	875	12,5	0	14	1986	2000	50	24	14	10	2	100	90
9	F	4,55	6,80	0	133	0	867	13,3	0	0	2000	2000	37	44	12	3	4	100	93
10	M	4,07	6,00	0	131	0	869	13,1	0	13	1987	2000	32	35	21	4	8	100	121
11	M	3,16	5,50	0	127	0	873	12,7	0	4	1996	2000	31	42	20	5	2	100	105
12	F	6,31	7,50	0	129	0	871	12,9	0	9	1991	2000	48	30	15	6	1	100	82
13	M	8,90	8,00	0	119	0	881	11,9	0	23	1977	2000	38	28	13	15	6	100	123
14	M	7,70	7,20	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	34	35	21	7	3	100	110
15	F	5,40	6,50	0	114	0	886	11,4	0	0	2000	2000	38	48	9	5	0	100	81
16	F	4,50	6,50	0	107	0	893	10,7	0	11	1989	2000	54	24	14	4	4	100	80
17	F	4,00	5,90	0	130	0	870	13	0	19	1981	2000	50	26	14	7	3	100	87
18	M	7,60	8,50	0	122	0	878	12,2	0	2	1998	2000	41	40	15	4	0	100	82
19	M	7,50	8,40	0	134	0	866	13,4	0	15	1985	2000	44	36	9	8	3	100	90
20	F	6,30	7,30	0	134	0	866	13,4	0	2	1998	2000	53	24	10	9	4	100	87
Média		6,24	7,12	0,05	127,65	0,00	872,30	12,77	0,05	10,10	1989,85		41,6	34,4	14,4	6,9	2,8		94,9
Mediana		6,31	7,25	0,00	128,00	0,00	872,00	12,80	0,00	8,50	1991,50		39,5	35,0	14,0	6,5	3,0		90,0
des/pad		1,9	0,9	0,2	12,4	0,0	12,3	1,2	0,2	8,3	8,3	0,0	7,5	7,6	3,8	3,0	2,1	0,0	12,9

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	4,0 µl/l (0,8 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	6,54	7,50	0	123	0	877	12,3	0	31	1969	2000	39	33	21	7	0	100	96
2	F	5,17	7,00	0	131	0	869	13,1	0	11	1989	2000	45	33	16	3	3	100	86
3	M	3,63	6,00	0	124	0	876	12,4	0	17	1983	2000	42	32	20	6	0	100	90
4	M	3,49	5,70	0	142	0	858	14,2	0	0	2000	2000	43	32	13	9	3	100	97
5	M	5,00	6,20	0	112	0	888	11,2	0	34	1966	2000	48	27	20	3	2	100	84
6	F	4,57	6,30	0	133	0	867	13,3	0	17	1983	2000	51	24	12	10	3	100	90
7	F	3,80	6,00	0	123	0	877	12,3	0	8	1992	2000	38	40	13	8	1	100	94
8	F	6,56	7,60	0	141	0	859	14,1	0	14	1986	2000	32	31	27	9	1	100	116
9	F	6,00	6,00	0	135	0	865	13,5	0	15	1985	2000	46	26	19	8	1	100	92
10	M	3,00	5,00	0	123	0	877	12,3	0	2	1998	2000	58	18	14	8	2	100	78
11	M	4,20	5,50	0	121	0	879	12,1	0	4	1996	2000	54	21	19	3	3	100	80
12	M	5,74	6,60	1	118	0	881	11,8	0	2	1998	2000	49	30	9	10	2	100	86
13	F	4,60	5,90	0	127	0	873	12,7	0	17	1983	2000	46	31	11	10	2	100	91
14	M	8,30	7,50	0	126	0	874	12,6	0	6	1994	2000	47	22	25	3	3	100	93
15	F	4,56	6,00	0	135	0	865	13,5	0	1	1999	2000	40	39	14	6	1	100	89
16	F	4,78	6,00	0	117	0	883	11,7	0	13	1987	2000	47	27	19	7	0	100	86
17	M	7,90	7,50	0	140	0	860	14	0	23	1977	2000	43	40	11	4	2	100	82
18	M	3,00	5,50	0	131	0	869	13,1	0	0	2000	2000	32	45	15	5	3	100	102
19	F	4,85	6,50	0	125	0	875	12,5	0	1	1999	2000	38	39	20	2	1	100	89
20	M	5,00	6,20	0	124	0	876	12,4	0	13	1987	2000	45	28	20	5	2	100	91
Média		5,03	6,33	0,05	127,55	0,00	872,40	12,76	0,00	11,45	1988,55		44,2	30,9	16,9	6,3			90,60
Mediana		4,82	6,10	0,00	125,50	0,00	874,50	12,55	0,00	12,00	1988,00		45,0	31,0	17,5	6,5			90,00
des/pad		1,5	0,7	0,2	8,2	0,0	8,2	0,8	0,0	10,0	10,0	0,0	6,6	7,1	4,8	2,7	1,1	0,0	8,3

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/litro (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	10,74	8,00	0	128	0	872	12,8	0	4	1996	2000	41	35	14	8	2	100	95
2	M	3,10	5,00	0	132	0	868	13,2	0	1	1999	2000	41	41	9	5	4	100	90
3	F	2,00	4,50	0	105	0	895	10,5	0	7	1993	2000	44	31	12	10	3	100	97
4	M	5,44	6,50	0	129	0	871	12,9	0	9	1991	2000	37	47	9	7	0	100	86
5	M	2,08	4,20	0	178	0	822	17,8	0	17	1983	2000	43	35	12	9	1	100	90
6	F	8,86	7,50	0	125	0	875	12,5	0	9	1991	2000	38	37	16	6	3	100	99
7	M	5,51	6,50	0	131	0	869	13,1	0	2	1998	2000	40	38	15	7	0	100	89
8	M	5,49	6,50	0	123	0	877	12,3	0	1	1999	2000	41	40	14	4	1	100	84
9	F	5,51	7,00	0	130	0	870	13	0	4	1996	2000	50	27	11	8	4	100	89
10	F	2,33	4,50	0	118	0	882	11,8	0	2	1998	2000	47	30	16	6	1	100	84
11	F	3,76	6,00	0	132	0	868	13,2	0	21	1979	2000	40	33	21	4	2	100	95
12	M	5,13	6,00	0	142	0	858	14,2	0	7	1993	2000	43	30	18	5	4	100	97
13	M	2,80	5,30	0	138	0	862	13,8	0	5	1995	2000	44	28	17	7	4	100	99
14	M	3,78	5,40	0	115	0	885	11,5	0	2	1998	2000	44	34	16	5	1	100	85
15	F	5,67	7,10	0	126	0	874	12,6	0	5	1995	2000	43	35	10	8	4	100	95
16	F	4,70	5,80	0	133	0	867	13,3	0	11	1989	2000	43	36	14	4	3	100	88
17	M	7,80	6,50	0	111	0	889	11,1	0	9	1991	2000	48	33	10	8	1	100	81
18	F	6,90	5,80	0	149	0	851	14,9	0	6	1994	2000	59	18	11	12	0	100	76
19	M	5,80	5,20	0	120	0	880	12	0	2	1998	2000	42	42	10	5	1	100	81
20	M	4,50	4,00	0	135	0	865	13,5	0	11	1989	2000	47	34	9	9	1	100	83
Média		5,10	5,87	0,00	130,00	0,00	870,00	13,00	0,00	6,75	1993,25		43,8	34,2	13,2	6,9	2,0		89,2
Mediana		5,285	5,90	0,00	129,50	0,00	870,50	12,95	0,00	5,50	1994,50		43,0	34,5	13,0	7,0	1,5		89,0
des/pad		2,3	1,1	0,0	15,3	0,0	15,3	1,5	0,0	5,3	5,3	0,0	4,8	6,2	3,4	2,2	1,5	0,0	6,7



Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/litro (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações	Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	7,90	8,00	0	118	0	882	11,8	0	2	1998	2000	37	36	18	7	2	100	101
2	M	6,75	7,00	0	148	0	852	14,8	0	4	1996	2000	33	39	21	6	1	100	103
3	M	5,62	6,50	0	131	0	869	13,1	0	1	1999	2000	38	33	24	2	3	100	99
4	F	9,10	7,30	0	121	0	879	12,1	0	2	1998	2000	34	43	19	2	2	100	95
5	M	8,33	7,50	0	135	0	865	13,5	0	17	1983	2000	31	45	15	8	1	100	103
6	F	7,05	7,50	0	139	0	861	13,9	0	4	1996	2000	27	47	23	2	1	100	103
7	F	8,87	8,00	0	154	0	846	15,4	0	11	1989	2000	40	32	20	7	1	100	97
8	F	10,55	8,50	0	136	0	864	13,6	0	12	1988	2000	30	42	21	5	2	100	107
9	F	7,58	8,00	0	127	0	873	12,7	0	10	1990	2000	34	39	23	2	2	100	99
10	F	6,42	7,50	0	117	0	883	11,7	0	10	1990	2000	41	32	14	11	2	100	101
11	F	6,52	7,50	0	110	0	890	11	1	0	1999	2000	52	25	15	6	2	100	81
12	F	5,56	6,70	0	125	0	875	12,5	0	3	1997	2000	38	35	16	9	2	100	102
13	M	6,89	7,00	0	138	0	862	13,8	0	4	1996	2000	41	37	18	4	0	100	85
14	M	5,70	6,40	0	143	0	857	14,3	0	1	1999	2000	34	43	15	5	3	100	100
15	M	6,90	7,20	0	136	0	864	13,6	0	15	1985	2000	53	30	11	5	1	100	71
16	F	7,45	7,80	0	116	0	884	11,6	0	5	1995	2000	62	21	9	4	4	100	67
17	M	6,30	7,10	0	128	0	872	12,8	0	11	1989	2000	45	36	12	5	2	100	83
18	M	7,20	7,50	0	133	0	867	13,3	0	24	1976	2000	54	22	19	4	1	100	76
19	M	7,50	7,60	0	137	0	863	13,7	0	7	1993	2000	43	35	19	2	1	100	83
20	F	7,80	7,90	0	120	0	880	12	0	9	1991	2000	44	28	21	5	2	100	93
Média		7,30	7,43	0,00	130,60	0,00	869,40	13,06	0,05	7,60	1992,35		40,6	35,0	17,7	5,1	1,8		92,5
Mediana		7,125	7,50	0,00	132,00	0,00	868,00	13,20	0,00	6,00	1994,00		39,0	35,5	18,5	5,0	2,0		98,0
des/pad		1,2	0,5	0,0	11,4	0,0	11,4	1,1	0,2	6,3	6,2	0,0	9,1	7,3	4,2	2,5	0,9	0,0	11,9

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	FOLICUR
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	2,0 µl/l (0,4 mg/l)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Escore	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	6,56	6,80	0	141	0	859	14,1	0	12	1988	2000	38	31	18	11	2	100	108
2	F	5,25	6,50	0	139	0	861	13,9	0	5	1995	2000	36	31	23	7	3	100	110
3	F	5,64	6,80	0	129	0	871	12,9	0	0	2000	2000	46	22	14	12	6	100	110
4	M	7,38	7,50	0	146	0	854	14,6	0	13	1987	2000	42	40	14	3	1	100	81
5	F	3,72	5,80	0	131	0	869	13,1	0	1	1999	2000	30	41	22	6	1	100	107
6	F	4,50	6,00	0	113	0	887	11,3	0	4	1996	2000	39	32	15	11	3	100	107
7	M	3,85	6,00	0	138	0	862	13,8	0	12	1988	2000	32	33	26	8	1	100	113
8	F	6,51	7,00	0	129	0	871	12,9	0	1	1999	2000	40	34	12	9	5	100	105
9	F	3,57	5,30	0	134	0	866	13,4	0	2	1998	2000	45	34	19	2	0	100	78
10	F	2,72	4,50	0	139	0	861	13,9	0	14	1986	2000	43	26	21	8	2	100	100
11	F	3,27	5,00	0	119	0	881	11,9	0	0	2000	2000	54	22	16	5	3	100	81
12	M	3,24	5,00	0	121	0	879	12,1	0	6	1994	2000	44	30	20	4	2	100	90
13	M	6,90	7,00	0	102	0	898	10,2	0	13	1987	2000	50	31	11	6	2	100	79
14	F	4,05	6,00	0	121	0	879	12,1	0	5	1995	2000	47	26	21	3	3	100	89
15	M	3,10	5,00	0	119	0	881	11,9	0	6	1994	2000	51	26	21	2	2	102	82
16	M	4,29	6,00	0	126	0	874	12,6	0	11	1989	2000	45	21	21	11	2	100	104
17	M	8,00	7,30	0	123	0	877	12,3	0	0	2000	2000	41	26	17	12	4	100	112
18	M	7,80	8,20	0	134	0	866	13,4	0	7	1993	2000	55	24	15	5	1	100	73
19	F	4,00	5,50	0	115	0	885	11,5	0	12	1988	2000	42	29	12	12	5	100	109
20	F	6,60	7,20	0	118	0	882	11,8	0	2	1998	2000	42	29	16	9	4	100	104
Média		5,05	6,22	0,00	126,85	0,00	873,15	12,69	0,00	6,30	1993,70		43,1	29,4	17,7	7,3	2,6		97,10
Mediana		4,395	6,00	0,00	127,50	0,00	872,50	12,75	0,00	5,50	1994,50		42,5	29,5	17,5	7,5	2,0		104,0
des/pad		1,7	1,0	0,0	11,1	0,0	11,1	1,1	0,0	5,1	5,1	0,0	6,5	5,5	4,1	3,5	1,6	0,4	13,7

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	5 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (F)

Características				Análise das Hemácias									Classes de Cometa						
nº	sexo	peso (g)	comp (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	4,25	6,00	0	123	0	877	12,3	0	5	1995	2000	49	23	11	12	5	100	101
2	M	4,11	6,00	0	115	0	885	11,5	0	12	1988	2000	35	43	15	6	1	100	95
3	F	8,00	7,30	0	122	0	878	12,2	0	2	1998	2000	43	27	18	9	3	100	102
4	F	3,00	5,00	0	134	0	866	13,4	0	7	1993	2000	41	30	19	9	1	100	99
5	M	4,25	6,00	0	123	0	877	12,3	0	11	1989	2000	49	29	16	3	3	100	82
6	M	2,50	4,80	0	124	0	876	12,4	0	6	1994	2000	51	21	18	8	2	100	89
7	M	9,07	8,00	0	156	0	844	15,6	0	5	1995	2000	58	16	16	9	1	100	79
8	M	5,37	6,50	0	134	0	866	13,4	0	0	2000	2000	62	12	12	8	6	100	84
9	F	4,17	6,00	0	119	0	881	11,9	0	8	1992	2000	53	20	18	7	2	100	85
10	M	6,97	7,00	0	132	0	868	13,2	0	9	1991	2000	42	31	19	5	3	100	96
11	M	4,05	6,00	0	112	0	888	11,2	0	13	1987	2000	53	23	12	8	4	100	87
12	F	10,00	8,30	0	137	0	863	13,7	0	11	1989	2000	52	19	18	9	2	100	90
13	F	5,70	6,60	0	126	0	874	12,6	0	2	1998	2000	32	34	20	10	4	100	120
14	F	5,90	7,00	0	135	0	865	13,5	0	3	1997	2000	38	36	15	9	2	100	101
15	F	7,20	7,50	0	131	0	869	13,1	0	6	1994	2000	31	30	22	15	2	100	127
16	M	4,80	5,20	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	49	26	16	9	0	100	85
17	F	6,70	5,80	0	126	0	874	12,6	0	15	1985	2000	49	27	15	6	3	100	87
18	M	5,90	6,80	0	135	0	865	13,5	0	1	1999	2000	41	34	16	4	5	100	98
19	F	5,30	6,50	0	127	0	873	12,7	0	2	1998	2000	56	20	13	7	4	100	83
20	F	6,00	6,90	0	141	0	859	14,1	0	7	1993	2000	47	23	13	9	8	100	108
Média		5,66	6,46	0,00	129,05	0,00	870,95	12,91	0,00	6,35	1993,65		46,6	26,2	16,1	8,1	3,1		94,90
Mediana		5,54	6,50	0,00	128,00	0,00	872,00	12,80	0,00	6,00	1994,00		49,0	26,5	16,0	8,5	3,0		92,50
des/pad		1,9	0,9	0,0	9,8	0,0	9,8	1,0	0,0	4,4	4,4	0,0	8,5	7,4	2,9	2,7	1,9	0,0	12,7

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	10 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (E)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocr		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	M	3,81	5,50	0	112	0	888	11,2	0	12	1988	2000	58	17	12	7	6	100	86
2	M	5,74	6,50	0	125	0	875	12,5	0	11	1989	2000	56	18	14	12	9	100	118
3	M	4,21	5,50	0	117	0	883	11,7	0	23	1977	2000	48	36	8	8	1	100	80
4	F	4,55	6,80	0	132	0	868	13,2	0	6	1994	2000	33	27	30	10	2	100	125
5	M	5,65	6,50	0	137	0	863	13,7	0	8	1992	2000	58	23	10	9	5	100	90
6	F	5,51	6,50	0	124	0	876	12,4	0	3	1997	2000	60	16	19	5	3	100	81
7	M	3,76	4,50	0	131	0	869	13,1	0	15	1985	2000	72	10	10	8	7	100	82
8	M	7,58	8,00	0	118	0	882	11,8	0	7	1993	2000	40	42	13	5	1	100	87
9	F	6,45	7,4	0	129	0	871	12,9	0	2	1998	2000	51	26	13	10	3	100	94
10	F	5,55	6,50	0	128	0	872	12,8	0	9	1991	2000	44	29	19	8	8	100	123
11	F	4,88	5,90	0	129	0	871	12,9	0	16	1984	2000	53	15	23	9	3	100	100
12	M	5,53	6,50	0	131	0	869	13,1	0	3	1997	2000	58	12	13	17	4	100	105
13	M	5,87	7,00	0	134	0	866	13,4	0	16	1984	2000	45	31	15	9	6	100	112
14	F	6,88	7,00	0	115	0	885	11,5	0	8	1992	2000	53	20	15	12	3	100	98
15	F	3,73	6,00	0	136	0	864	13,6	0	15	1985	2000	45	23	23	9	1	100	100
16																			
17																			
18																			
19																			
20																			
Média		5,31	6,34	0,00	126,53	0,00	873,47	12,65	0,00	10,27	1989,73		23,0	51,6	9,2	15,8			98,73
Mediana		5,53	6,50	0,00	129,00	0,00	871,00	12,90	0,00	9,00	1991,00		23,0	53,0	9,0	14,0			98,00
des/pad		1,2	0,8	0,0	7,8	0,0	7,8	0,8	0,0	5,9	5,9	0,0	9,5	9,0	6,0	3,0	2,6	0,0	15,1

Espécie:	LAMBARI - <i>Astyanax sp</i>	Xenobionte:	MIX (Roundup + Folicur)
Tempo e modo de exposição	15 dias - hídrica	Concentração:	6,6 µl/l (R) + 4,0 µl/l (E)

Características				Análise das Hemácias								Classes de Cometa							
nº	sexo	peso (g)	comp. (cm)	Policromáticos		Normocromáticos		% PCE	MN	Alterações Normais	Total	0	1	2	3	4	Total	Score	
				com MN	sem MN	com MN	sem MN												
1	F	4,20	6,50	0	117	1	882	11,7	0	23	1977	2000	54	19	16	7	4	100	88
2	M	5,50	6,00	0	125	0	875	12,5	0	12	1988	2000	60	14	15	5	6	100	83
3	F	7,70	7,20	0	123	0	877	12,3	0	12	1988	2000	54	19	12	10	5	100	93
4	F	12,20	8,50	0	126	0	874	12,6	0	3	1997	2000	49	22	15	11	3	100	97
5	M	4,60	6,20	0	134	0	866	13,4	0	8	1992	2000	54	23	12	11	0	100	80
6	M	5,40	6,50	0	128	0	872	12,8	0	7	1993	2000	34	32	23	6	5	100	116
7	M	8,40	7,50	0	121	0	879	12,1	0	0	2000	2000	59	17	13	8	3	100	79
8	F	10,80	8,20	0	145	0	855	14,5	0	10	1990	2000	59	9	13	12	7	100	99
9	F	8,90	8,00	0	135	0	865	13,5	1	9	1990	2000	40	22	26	10	2	100	112
10	M	5,70	7,00	0	135	0	865	13,5	0	27	1973	2000	35	36	20	9	0	100	103
11	M	7,50	7,50	0	122	0	878	12,2	0	13	1987	2000	46	29	14	6	5	100	95
12	F	12,00	8,30	0	127	0	873	12,7	0	1	1999	2000	47	35	9	8	1	100	81
13	F	6,55	7,50	0	133	0	867	13,3	0	2	1998	2000	56	18	13	9	4	100	87
14	F	10,00	8,10	0	127	0	873	12,7	0	4	1996	2000	36	39	19	3	3	100	98
15	M	8,00	7,30	0	123	0	877	12,3	0	15	1985	2000	32	33	19	12	4	100	123
16	M	7,60	7,20	0	126	0	874	12,6	0	18	1982	2000	36	38	15	7	4	100	105
17	F	9,20	8,00	0	144	0	856	14,4	0	21	1979	2000	47	22	17	12	2	100	100
18																			
19																			
20																			
Média		7,90	7,38	0,00	128,88	0,06	871,06	12,89	0,06	10,88	1989,06		46,9	25,1	15,9	8,6	3,4		96,41
Mediana		7,70	7,50	0,00	127,00	0,00	873,00	12,70	0,00	10,00	1990,00		47,0	22,0	15,0	9,0	4,0		97,00
des/pad		2,4	0,8	0,0	7,8	0,2	7,7	0,8	0,2	8,0	8,0	0,0	9,7	9,0	4,3	2,7	2,0	0,0	12,8

## 7.2 PROTOCOLO DO ENSAIO COMETA – MÉTODO ALCALINO

### 7.2.1 Solução de Lise - Estoque

Quantidades para 1000ml de Solução Estoque		
Quantidades	Produto	PM
<b>890 ml</b>	H <sub>2</sub> O destilada ou milique ou milipore ou dionizada	
<b>146,1 g</b>	NaCl (Cloreto de Sódio) 2,5 M	
<b>37,2 g</b>	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100mM	372,24 <sup>2</sup>
<b>1,2 g</b>	TRIS 10mM	121,14
<b>8 g</b>	NaOH (Hidróxido de Sódio) sólido	40,0
Dissolver estes reagentes em 890 ml de água.		
Acertar o pH com NaOH ► <b>pH=10</b>		
<b>10 g</b>	Lauril Sarcosinato de Sódio	
Atenção: misturar bem lentamente, muito lentamente mesmo, á solução. Com este procedimento evita-se a formação de grumos.		
<i>Observações:</i>		
a) Todo procedimento é realizado sem aquecimento da solução.		
b) A solução pode ser estocada a temperatura ambiente, no escuro.		
c) Nestas condições a solução pode ser mantida até o seu uso total.		
d) Normalmente 8 g de NaOH é suficiente para ajustar o pH.		

<sup>2</sup> Este é o peso molecular ideal

## 7.2.2 Solução de Lise - Uso

Quantidades para 100ml de Solução de uso		
Quantidades	Produto	PM
<b>1 ml</b>	Triton X - 100	
<b>10 ml</b>	DMSO	
<b>89 ml</b>	Solução Estoque	
<b>Importante</b> = Fazer e Manter sempre no escuro		
<i>Observações:</i>		
a) Misturar bem – invertendo a proveta.		
b) Fazer a solução no escuro.		
c) Deixar a solução na cubeta de lâminas no escuro, por 60 min em temperatura de 4° C, antes de colocar as lâminas.		
d) Para pegar o Triton utiliza-se uma micropipeta. Cortar a ponta para aplicar, devido á viscosidade do Triton.		
e) Colocar as lâminas na cubeta e deixar de 1 h a 24 h – depende do tipo de ensaio – normalmente 1h é suficiente		
f) Após o uso jogar fora o restante da solução.		

## 7.2.3 Tampão de Eletroforese

<b>Solução de NaOH ( 300mM)</b>	
Quantidade	Produto
<b>19,2 g</b>	NaOH
<b>48 ml</b>	Água deionizada
Observação: Estocar em temperatura ambiente. Prazo de 15 dias.	
<b>Solução Estoque de EDTA (200mM)</b>	
<b>14,89 g</b>	EDTA
<b>200 ml</b>	Água deionizada
Observações:	
a) Pode ser estocada " <i>ad eternum</i> ".	
b) Acertar o <b>pH para 10</b> com pastilhas de NaOH.	
<b>Solução de uso</b>	
<b>1600 ml</b>	H <sub>2</sub> O deionizada gelada (4°C)
<b>8 ml</b>	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100mM
<b>48 ml</b>	NaOH (Hidróxido de Sódio)
Acertar o pH com NaOH ► <b>pH&gt;13</b>	
<i>Observações:</i>	
a) Fazer tampão fresco para cada corrida e colocar em geladeira.	
b) Lembrar sempre de misturar bem os reagentes.	
c) Volume total de tampão depende da capacidade da cuba de eletroforese	
d) Acertar a amperagem e a voltagem acrescentando ou tirando tampão	
e) Aproximadamente = <b>25 V e 292 mA</b>	



## 7.2.4 Tampão de Neutralização

Quantidade	Produto
<b>24,25 g</b>	TRIS
<b>475 ml</b>	Água deionizada
Observação.	
a) Acertar o <b>pH para 7,5</b> com HCl.	
b) Estocar em temperatura ambiente.	
c) Esta solução pode fungar facilmente.	
Solução de Coloração - Estoque	
<b>10mg</b>	Brometo de Etídeo
<b>50 ml</b>	Água deionizada
<i>Observação:</i> Estocar em temperatura ambiente.	
Solução de Coloração - Uso	
<b>1 ml</b>	Solução Estoque
<b>9 ml</b>	Água deionizada
<i>Observação:</i>	
a) Filtrar caso necessário.	

## 7.2.5 PBS

Quantidades para 100ml de Solução de uso		
Quantidades	Produto	PM
<b>0,2 g</b>	KCl - Cloreto de Potássio	74,55
<b>0,2 g</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ – Fosfato de potássio monobásico	136,09
<b>8 g</b>	NaCl – Cloreto de Sódio	58,44
<b>1,15 g</b>	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ – Hidrogênio-fosfato disódico anidro	141,96
<b>1000 ml</b>	Água deionizada	
<i>Observações:</i>		
a) Acertar o <b>pH para 7,4 *</b>		
b) Estocar em refrigerador		
c) Fazer no balão volumétrico		

\* Normalmente o pH atinge este valor. Caso isto não ocorra é possível que os reagentes estejam com problemas ou houve erro na pesagem destes.

## 7.2.6 Agarose normal 1,5 %

Quantidades para 100ml de Solução de uso		
Quantidades	Produto	PM
<b>1,5 g</b>	Agarose Normal	
<b>100 ml</b>	PBS	
<i>Etapas da preparação:</i>		
01) Dissolver bem, agitando por um tempo de aproximadamente 2h.		
02) Colocar para aquecer.		
03) Quando levantar fervura desligar. Agitar a solução (Pode deixar a pulga dentro).		
04) Deixar solidificar a temperatura ambiente.		
05) Picar em pedaços e voltar a ferver cuidando para não derramar. Agitar a solução.		
06) Deixar solidificar a temperatura ambiente.		
07) Repetir a etapa 5.		
08) Levar para o banho-maria a <b>80 °C</b> – O banho deve ficar no nível da agarose.		
09) Mergulhar as lâminas na agarose, devendo alcançar a parte esmerilhada.		
10) Procurar formar uma camada bem fina de agarose.		
11) Retirar a lâmina e limpar com papel o lado oposto da parte esmerilhada.		
12) Secar a lâmina "overnight" em temperatura ambiente na horizontal. Estas lâminas podem ser estocadas então por várias semanas.		
<i>Observação:</i> As lâminas devem ser bem limpas (pode ser com etanol).		

### 7.2.7 Agarose de Baixo Ponto de Fusão (LMP) - 0,5%

Quantidades para 20ml de Solução de uso	
Quantidades	Produto
<b>0,1 g</b>	Agarose de Baixo ponto de Fusão - LMP
<b>20 ml</b>	PBS
<i>Etapas da preparação:</i>	
01) Dissolver bem.	
02) Colocar para aquecer.	
03) Quando levantar fervura desligar. Agitar a solução.	
04) Deixar em banho-maria a 37 °C.	

## 7.2.8 Metodologia

01) Adicionar 120 $\mu$ l de agarose de baixo ponto de fusão com 5 a 15 $\mu$ l de suspensão celular. <sup>3</sup>
02) Cobrir com lamínula e condicionar em refrigerador durante 10 – 20 min.
03) Após a adição das células na lâmina evitar exposição a luz direta.
04) Retirar as lamínulas gentilmente.
05) Colocar as lâminas em solução de lise e colocar em refrigerador (4 °C) por uma 1h. (As lâminas podem permanecer na solução de lise por até 4 semanas. Caso ocorra precipitação da solução de lise as lâminas podem ser lavadas gentilmente em PBS antes da eletroforese).
06) Após o tempo de lise remover as lâminas gentilmente.
07) Colocar as lâminas na cuba horizontal de eletroforese preenchendo o máximo possível os espaços. Caso seja necessário completar com lâminas limpas.
08) Adicionar o tampão de eletroforese suavemente até cobrir as lâminas.
09) Deixar o DNA desnaturando no tampão alcalino por um tempo de 20 a 60 min. (Normalmente 25 min é suficiente).
10) Realizar a eletroforese mergulhando a cuba em gelo (4 °C).
11) Iniciar a eletroforese (25V, 300mA). Correr por 10 – 40 min (25 min é o recomendado).
12) Terminada a eletroforese retira-se as lâminas cuidadosamente e neutraliza-se com 5 ml de solução, por 5 minutos.
13) Repete-se a neutralização por mais duas vezes.
14) Secar as lâminas na posição inclinada e fixar com etanol por 5 min.
15) Estocar as lâminas, se necessário, em geladeira.
16) Para a coloração adicionar 20 $\mu$ l de brometo de etídeo e cobrir com lamínula. Descansar por 5 min no escuro antes da análise. Analisar imediatamente.

<sup>3</sup> No caso de sangue de peixes, misturar 10 $\mu$ l de sangue total com 1000  $\mu$ l de RPMI, ou Soro Bovino Fetal ou Solução Fisiológica ou PBS, misturar bem e então pegar 10  $\mu$ l desta solução e misturar com 120  $\mu$ l de LMP.