



## CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação da qualidade da água do Rio Ijuí utilizando o teste de micronúcleo em peixes*****Ijuí River water quality assessment using the micronucleus test in fish***Emitério da Rosa Neto<sup>1</sup>, Günther Gehlen<sup>2</sup>, Luciano Basso da Silva<sup>3</sup>**RESUMO**

As principais fontes de contaminação do Rio Ijuí são o escoamento superficial das lavouras e o esgoto doméstico. O teste de micronúcleo (MN) em peixes é uma ferramenta útil na avaliação da qualidade da água, indicando a presença de substâncias tóxicas. Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade da água do Rio Ijuí utilizando o teste de MN em uma espécie de peixe nativa da família Characidae. Os indivíduos foram coletados no inverno (2012) e no verão (2013) em dois pontos no Rio Ijuí, distantes aproximadamente 170 Km, os quais apresentam a agricultura como principal atividade econômica, mas diferem em densidade demográfica. A frequência de MN não apresentou diferenças entre os locais. No entanto, em ambos os pontos, a frequência de MN no verão (2,15‰ e 2,13‰, nos pontos 1 e 2, respectivamente) foi significativamente maior do que no inverno (0,35‰ no ponto 1 e 0,45‰ no ponto 2). Não houve diferenças significativas para as outras anormalidades nucleares. Os resultados indicam a ocorrência de variação temporal na contaminação mutagênica da água do Rio Ijuí e que pode estar relacionada às atividades agrícolas, já que o verão é o período em que os agrotóxicos são utilizados com maior frequência na região.

**Palavras-chave:** Biomonitoramento; genotoxicidade; poluição aquática.

**ABSTRACT**

*The main sources of contamination of the Ijuí River are crops and domestic sewage surface runoff. The micronucleus test (MN) in fish is a useful tool for water quality assessment, indicating the presence of toxic substances. This study aimed to assess the Ijuí River water quality by using the MN test in a native fish specie from the Characidae family. The fish were collected in winter (2012) and summer (2013) at two sites on the Ijuí River, approximately 170 km away, which have agriculture as the main economic activity, but differ in population density. The MN frequency showed no differences between the sites. However, at both sites, the frequency of MN in summer (2.15‰ and 2.13‰, at points 1 and 2, respectively) was significantly higher than in winter (0.35‰ at point 1 and 0.45‰ at point 2). There were no significant differences for other nuclear abnormalities. The results indicate the occurrence of temporal variation in the mutagenic contamination of the Ijuí River water, which may be*

<sup>1</sup> Universidade Feevale, Novo Hamburgo/RS – Brasil. E-mail: [erosbio@yahoo.com.br](mailto:erosbio@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> E-mail: [guntherg@feevale.br](mailto:guntherg@feevale.br)

<sup>3</sup> E-mail: [lucianosilva@feevale.br](mailto:lucianosilva@feevale.br)



related to agricultural activities, since summer is the period when pesticides are mostly used in the region.

**Keywords:** *Biomonitoring; genotoxicity; water pollution.*

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição aquática tornou-se um problema ambiental global. Alguns produtos químicos presentes em efluentes industriais, agrícolas e domésticos são altamente tóxicos e, dependendo da dose e duração da exposição, podem causar sérios danos aos organismos aquáticos. (ALI *et al.*, 2019). Cerca de um terço dos poluentes são descritos como potencialmente genotóxicos para os organismos vivos (OHE *et al.*, 2004), sendo considerados a principal preocupação para os ecossistemas aquáticos, pois não há nível de segurança ambiental que elimine o risco mesmo em baixas concentrações. (BELPOMME *et al.*, 2007). Danos no DNA estão relacionados com o surgimento de câncer bem como de alterações genéticas hereditárias. (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Devido ao amplo espectro de compostos genotóxicos as vias de entrada no ambiente aquático são diversas e incluem deposição atmosférica, escoamento superficial e lançamento de efluentes domésticos e industriais. (SHULIAKEVICH *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, o monitoramento da qualidade da água é realizado através do perfil físico-químico das amostras. Entretanto, a partir dessa análise não há como prever a biodisponibilidade e/ou os efeitos de contaminantes sobre a biota aquática. (SERIANI *et al.*, 2015). Neste cenário, o levantamento dos efeitos da poluição em organismos coletados em campo é primordial como ferramenta para o diagnóstico de saúde ambiental e como meio de entender como uma contaminação pode afetar o funcionamento de todo um ecossistema. (UDROIU, 2006; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). O estudo de biomarcadores na biota aquática fornece informações de relevância ecológica sobre os efeitos adversos causados pela exposição a uma mistura de contaminantes da água mesmo na ausência da análise físico-química. (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A análise de alterações no DNA em organismos aquáticos tem se mostrado um método capaz de detectar a exposição a baixas concentrações de contaminantes em uma ampla gama de espécies. (DHAWAN *et al.*, 2009). Os peixes são excelentes organismos sentinela para avaliação *in situ* do potencial genotóxico de contaminantes em ecossistemas aquáticos, pois concentram poluentes em corpos hídricos. (UDROIU, 2006). Nesse contexto, o teste de micronúcleo (MN) tornou-se uma ferramenta eficiente para detectar efeitos genotóxicos em peixes expostos a contaminantes da água. (UDROIU, 2006; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Este teste consiste em detectar mutações cromossômicas induzidas por poluentes aneugênicos (provocam perdas de cromossomos) e clastogênicos (causam quebras cromossômicas). (UDROIU, 2006). Além disso, o teste de MN em peixes permite a análise concomitante de outras alterações nucleares eritrocitárias, consideradas biomarcadores de citotoxicidade. (AYLLON; GARCIA-VASQUEZ, 2000). O teste de MN em peixes também tem sido o biomarcador mais utilizado para avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos no Brasil. (DALZUCHIO *et al.*, 2016; GOMES *et al.* 2019).



O presente estudo utilizou uma espécie de peixe comumente conhecida como Lambari como bioindicadora. Lambari é um grupo de pequenos peixes de água doce da família Characidae. (MIRANDE, 2010). Este grupo de peixes representa uma grande diversidade e está amplamente distribuído desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. (LIMA *et al.*, 2003). A maioria das espécies de Lambari pertencem aos gêneros *Astyanax* e *Deuterodon*, habitam ambientes pelágicos de água doce, possuem hábitos alimentares oportunistas omnívoros e desempenham um papel importante nos ecossistemas como a principal presa de peixes carnívoros. (MANNA *et al.*, 2012). No Brasil, o teste MN tem sido utilizado com sucesso em espécies de Lambari. (FRANCISCO *et al.*, 2019; WACHTEL *et al.*, 2019).

A Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí está localizada na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas geográficas 28° 00' a 29° 05' de latitude Sul e 53° 11' a 55° 21' de longitude Oeste, possui uma área de drenagem de 10.779 km<sup>2</sup>, com 36 municípios e 508.336 habitantes. O Rio Ijuí é um dos principais afluentes da margem esquerda da Bacia do Rio Uruguai. Cerca de 90% da área da bacia é utilizada para agricultura. Os principais usos da água são destinados à irrigação (soja, milho e trigo como principais culturas) e abastecimento público. (FEPAM, 2010). Apesar da importância da bacia do Rio Ijuí para as atividades econômicas e de saúde pública, até o momento nenhum estudo investigou os efeitos genotóxicos dos contaminantes da água. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença *in situ* de substâncias mutagênicas no Rio Ijuí utilizando o teste de micronúcleo em peixes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Cerca de 10 espécimes juvenis (3-4 cm) de uma espécie não identificada de peixe da família Characidae foram coletados com auxílio de puçás no inverno de 2012 e no verão de 2013 em dois pontos de amostragem no Rio Ijuí, separados por cerca de 170 Km (Figura 1). A identificação dos peixes ao nível de espécie não foi possível devido ao tamanho reduzido dos indivíduos. O ponto 1 (028° 17' 05" S e 053° 48' 32,6" W) está localizado no trecho superior da bacia e a montante de um dos maiores centros urbanos da região (o município de Ijuí tem cerca de 79.000 habitantes). O ponto 2 (028° 03' 03,2" S e 055° 10' 49,2" W) está localizado a cerca de 30 Km da foz do Rio Ijuí, em região de baixa densidade populacional, no município de Pirapó (cerca de 2.700 habitantes). Em ambos os pontos, a agricultura é a principal atividade econômica. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (parecer 03.12.021).

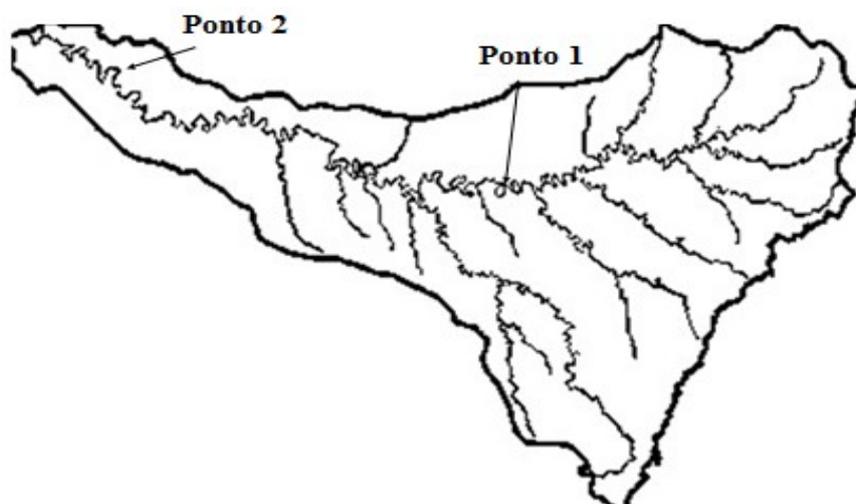
Imediatamente após a coleta dos espécimes, foram realizados esfregaços de sangue periférico obtido a partir de um corte da região caudal. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 min e coradas com Giemsa 5% por 10 min. Para análise de MN, 2000 eritrócitos foram examinados usando um microscópio de luz com ampliação de 1000x. Todas as lâminas foram codificadas e examinadas por um único observador. Outras anomalias, como invaginações no núcleo, brotos nucleares e células binucleadas foram registradas como anomalias nucleares (AN).

As variáveis citogenéticas estudadas desviaram significativamente da normalidade e, portanto, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado aos dados, com



correção de Bonferroni. O nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico para ciências sociais (SPSS) para Windows, versão 18.0.

**Figura 1** - Mapa da Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí indicando os pontos de coleta. Ponto 1 - município de Ijuí. Ponto 2 - município de Pirapó.



Fonte: Elaborada pelos autores.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise da frequência de MN são apresentados na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre os pontos 1 e 2, tanto no inverno quanto no verão. No entanto, na coleta de verão, houve aumento significativo na frequência de MN em ambos os pontos em comparação com o inverno.

**Tabela 1** - Frequência de MN por 1.000 células (média  $\pm$  desvio padrão - tamanho da amostra entre parênteses) observada em peixes capturados nos pontos 1 e 2 do Rio Ijuí durante as estações de inverno e verão.

Ponto de coleta	Inverno	Verão	P
Ponto 1	0.35 $\pm$ 0.41 (10)	2.15 $\pm$ 1.89 (10)	0.02
Ponto 2	0.45 $\pm$ 0.44 (10)	2.13 $\pm$ 2.70 (8)	0.03
P	0.63	0.79	

Fonte: Elaborada pelos autores.

Não foram observadas diferenças para as demais anormalidades nucleares, nem entre os pontos nem entre os períodos de coleta (Tabela 2).

A frequência basal de MN em peixes mostra grande variabilidade interespecies e geralmente é baixa. (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). As frequências médias de MN observadas no inverno nos sítios 1 e 2 (0,35 e 0,45 por 1.000 células, respectivamente) são semelhantes às encontradas para a maioria das espécies, para as quais as médias variam de 0 a 1 MN por 1.000 células. (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Entretanto, uma campanha apenas não pode indicar a frequência basal de MN



em uma espécie e não existem outros estudos com peixes do Rio Ijuí para comparação. Independentemente disso, as frequências de MN observadas no verão nos dois pontos de coleta superaram significativamente os valores observados no inverno, indicando exposição a substâncias mutagênicas.

**Tabela 2** – Frequência de anormalidade nucleares por 1.000 células (média  $\pm$  desvio padrão) observada em peixes capturados nos pontos 1 e 2 do Rio Ijuí durante as estações de inverno e verão.

Ponto de coleta	Inverno	Verão	P
Ponto 1	5.05 $\pm$ 5.05	2.05 $\pm$ 1.38	0.32
Ponto 2	4.45 $\pm$ 3.35	6.69 $\pm$ 8.80	0.72
P	0.82	0.34	

Fonte: Elaborada pelos autores.

Embora os mecanismos subjacentes à formação de anormalidades nucleares (AN) eritrocitárias não sejam completamente conhecidos, vários autores sugeriram que a ocorrência de AN representa uma manifestação dos efeitos dos xenobióticos e pode complementar a análise de micronúcleos. (ÇAVAS; KÖNEN, 2008; AYLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; MURANLI; GÜNER, 2011). Neste estudo, os contaminantes presentes no verão no Rio Ijuí não apresentaram efeitos significativos sobre a ocorrência de AN, porém apresentaram maior potencial para indução de MN.

Os peixes concentram poluentes e, em estudos de campo, o aumento da frequência de MN pode ser resultado da exposição crônica a agentes mutagênicos, mesmo quando em baixas concentrações. (UDROIU, 2006). Em vários estudos foram observadas taxas elevadas de MN em peixes durante todo o período de monitoramento, indicando contaminação constante e exposição crônica. (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; BATISTA *et al.*, 2016; REBOK *et al.*, 2017; PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2019). Por outro lado, a variação sazonal ou temporal na frequência de MN observada no Rio Ijuí também foi relatada por outros autores (BUSCHINI *et al.*, 2004; WIRZINGER *et al.*, 2007) e pode ser resultado da concentração de contaminantes relacionada a baixos níveis de chuva, como ocorre em alguns períodos do verão. No caso do Rio Ijuí, seria esperado que o ponto 1, com maior densidade demográfica e maior carga de lançamento de efluentes domésticos e urbanos, apresentasse concentração de poluentes mutagênicos e conseqüentemente, aumento da taxa de MN. O volume de precipitação observado nos 10 dias anteriores à coleta no ponto 1 foi de 58 mm no inverno e 13 mm no verão, o que poderia indicar concentração de contaminantes no verão. Entretanto, no ponto 2 os volumes de chuva foram similares, 25 mm no inverno e 24 mm no verão e houve aumento de efeitos mutagênicos nos dois pontos estudados. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato de que os organismos aquáticos podem ser brevemente expostos a contaminantes, como os agrotóxicos, em decorrência do intenso escoamento superficial. Considerando que a agricultura é a principal atividade econômica nos dois locais estudados, é possível que quando chuvas fortes ocorrem após a aplicação de agrotóxicos, o intenso escoamento superficial cause a contaminação da água do rio. Cabe ressaltar que o uso de agrotóxicos nesta região é mais intenso no verão. Nesse sentido, foi observado que o escoamento agrícola está associado ao aumento de danos ao DNA em peixes.



(WHITEHEAD *et al.*, 2004; BONY *et al.*, 2008; POLARD *et al.*, 2011). Conforme citado anteriormente, o Rio Ijuí é um afluente do Rio Uruguai e pode estar contribuindo com a contaminação por agrotóxicos. Nesse sentido, Gonçalves *et al.* (2020) realizaram um estudo com a espécie de peixe *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) em dois pontos do Rio Uruguai localizados no município de Itaquí, RS. Foram encontrados sete tipos de agrotóxicos na água do rio e oito no músculo dos peixes.

Estudos sobre a citogenotoxicidade da água na bacia do Rio Ijuí são escassos, porém todos eles demonstram efeitos tóxicos. Lassen *et al.* (2021) coletaram amostras de água em quatro pontos do Rio Ijuí e realizaram a exposição em laboratório da espécie de peixe *Danio rerio* por 96h. Não foram observadas alterações na frequência de MN, entretanto, a água dos quatro pontos amostrais induziu aumento significativo de anormalidade nucleares em comparação com o controle negativo. Jacoboski e Fachinetto (2022) avaliaram amostras de água de quatro pontos do Arroio Matadouro, localizado no município de Ijuí, e observaram alterações citotóxicas (índice mitótico) e genotóxicas (alterações cromossômicas) em células do meristema apical de raízes de cebola (*Allium cepa*).

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o Rio Ijuí apresenta contaminação por substâncias mutagênicas para as espécies de peixes, sendo possível sugerir que a principal fonte de contaminação se dá pelo escoamento de agrotóxicos e seus inúmeros aditivos químicos. No entanto, as possíveis fontes de contaminação crônica ou ocasional, bem como o efeito da sazonalidade ou chuva sobre os danos no DNA dos peixes devem ser investigados na área do Rio Ijuí. Destaca-se ainda a urgência de estudos sobre a contaminação química de uma forma geral bem como da presença de agrotóxicos neste importante recurso hídrico.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals. Environmental persistence, toxicity and bioaccumulation. **Hindawi Journal of Chemistry**, v.14, 2019.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 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**, v.467, p.177-186, 2000.

BATISTA, N. J.; CAVALCANTE, A. A. de C. M.; OLIVEIRA M. G. de; MEDEIROS, E. C.; MACHADO, J. L.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, J. F.; SANTOS C. E. dos; DUARTE, A.; SILVA F. R. da; SILVA, J. da. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere**, v.164, p.134-141, 2016.

BELPOMME, D. *et al.* The multitude and diversity of environmental carcinogens. **Environmental Research**, v.105, n.3, p.414-29, 2007.



- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v.26, p.205-213, 2011.
- BONY, S. *et al.* Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. **Aquatic Toxicology**, v.89, p.197-203, 2008.
- BUSCHINI, A. *et al.* Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. **Mutation Research**, v.557, p.119-129, 2004.
- ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. **Aquatic Toxicology**, v.90, p.154-159, 2008.
- DALZOCHIO, T. *et al.* The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International aquatic research**, v.8, p.283-298, 2016.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v.25, p.5-32, 2009.
- FEPAM. **Qualidade das águas da Bacia Hidrográfica do Rio Ijuí**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental, 2010. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br>. Acesso em: 20 mai. 2022.
- FRANCISCO, C. M. *et al.* Genotoxicity assessment of polluted urban streams using a native fish *Astyanax altiparanae*. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v.82, p.514-523, 2019.
- GOMES, L. C. *et al.* Genotoxicity effects on *Geophagus brasiliensis* fish exposed to Doce River water after the environmental disaster in the city of Mariana, MG, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.79, p.659-664, 2019.
- GONÇALVES, C. *et al.* Ecological impacts of pesticides on *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) from the Uruguay river, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.205, p.111314, 2020.
- JACOBOSKI, B. K.; FACHINETTO, J. Avaliação da qualidade da água do Arroio Matadouro, Ijuí, Rio Grande do Sul, por parâmetros físico-químicos e pelo teste de *Allium cepa*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.27, n.3, p.489-497, 2022.
- LASSEN, M. F. M. *et al.* Danos celulares em eritrócitos *Danio rerio* submetidos à água antropizada. **Revista Ambiente & Água**, v.16, n.1, e2577, 2021.
- LIMA, F. C. T. *et al.* Genera incertae sedis in Characidae, In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. E.; FERRARIS JR., C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of south and central america**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p.106-169.
- MANNA, L. R.; REZENDE, C. F.; MAZZONI, R. Plasticity in the diet of *Astyanax taeniatus* in a coastal stream from south-east Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.72, p.919-928, 2012.
- MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v.8, p.385-568, 2010.



MURANLI, F. D. G.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research**, v.726, p.104-108, 2011.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.67, p.109-149, 2004.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; TORRES JUNIOR, A. R.; SILVA, D.; SANTOS, R. L.; FORTES CARVALHO NETA, R. N. A screening test based on hematological and histological biomarkers to evaluate the environmental impacts in tambaqui (*Colossoma macropomum*) from a protected area in Maranhão, Brazilian Amazon. **Chemosphere**, v.214, p.445-451, 2019.

POLARD, T. *et al.* Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. **Aquatic Toxicology**, v.101, p.126-34, 2011.

REBOK, K.; JORDANOVA, M.; SLAVEVSKA-STAMENKOVIĆ, V.; IVANOVA, L.; KOSTOV, V.; STAFILOV, T.; ROCHA, E. Frequencies of erythrocyte nuclear abnormalities and of leucocytes in the fish *Barbus peloponnesius* correlate with a pollution gradient in the River Bregalnica (Macedonia). **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, p.10493-10509, 2017.

SERIANI, R. *et al.* Vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.112, p.162-168, 2015.

SHULIAKEVICH, A. *et al.* Assessing the genotoxic potential of freshwater sediments after extensive rain events - Lessons learned from a case study in an effluent-dominated river in Germany. **Water research**, v.209, p.117921, 2021.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v.79, p.201-204, 2006.

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

WACHTEL, C. C. *et al.* Waterborn genotoxicity in southern Brazil using *Astyanax bifasciatus* (Pisces: Teleostei). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.102, p.59-65, 2019.

WHITEHEAD, A.; KUIVILA, K. M.; ORLANDO, J. L.; KOTELEVTSSEV, S.; ANDERSON, S. L. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, p.2868-77, 2004.

WIRZINGER, G.; WELTJE, L.; GERCKEN, J.; SORDYL, H. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool? **Mutation Research**, v.628, p.19-30, 2007.

Submetido em: **29/07/2022**

Aceito em: **03/10/2022**