



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

NÉDIA DE CASTILHOS GHISI

Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana

Maringá
2013

NÉDIA DE CASTILHOS GHISI

Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis

Maringá
2013

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM, Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

- G426a Ghisi, Nédia de Castilhos, 1985-
Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana / Nédia de Castilhos Ghisi. -- Maringá, 2013.
58 f. : il. (algumas color.).
- Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2013.
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Helena Cristina Silva de Assis.
1. *Astyanax* aff. *paranae* (Teleostei, Characidae) "lambari" - Biomarcadores - Contaminação aquática - Paraná (Estado). 2. Ecotoxicologia - Biomarcadores. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -597.4817275098162
NBR/CIP - 12899 AACR/2

NÉDIA DE CASTILHOS GHISI

Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Alberto José Prioli
Nupélia/ Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof.^a Dr.^a Patrícia Carla Giloni de Lima
Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro)

Dr. Ricardo Massato Takemoto
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof.^a Dr.^a Wanessa Algarte Ramsdorf
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Maringá, 12 de dezembro de 2013.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho ao meu pai (*in memorium*).

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho existiram muitas pessoas e instituições que sempre estiveram ao meu lado oferecendo suporte, força e apoio em momentos difíceis. Dentre estes gostaria de agradecer:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao PROEX, pela bolsa e por todo suporte financeiro fornecido ao longo destes três anos.

À Fundação Araucária e Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, pelo financiamento de parte do projeto.

Ao Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade da Reserva Biológica das Perobas pela licença de coleta e pelo auxílio durante as coletas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) e a todos os seus professores que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), pela disponibilização da estrutura e pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Alberto José Prioli pela confiança, pelos valiosos conselhos e pelo apoio sempre que precisei.

A minha coorientadora Helena Cristina da Silva de Assis, por todo apoio, confiança e ensinamentos.

Aos professores membros da banca: Horácio, Patrícia, Ricardo e Wanessa e aos suplentes pelas contribuições.

A minha família e em especial ao meu marido, que sempre me apoiaram incondicionalmente.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

Se naquele instante caísse na Terra um habitante de Marte, havia de ficar embasbacado ao verificar que em um dia tão maravilhosamente belo e macio, de sol tão dourado, os homens em sua maioria estavam metidos em escritórios, oficina, fábricas... e se perguntasse a qualquer um dele: 'homem, por que trabalhas com tanta fúria durante todas as horas de sol?' – Ouviria esta resposta singular: 'para ganhar a vida'... e no entanto, a vida ali estava a se oferecer toda, numa gratuidade milagrosa. Os homens viviam tão ofuscados por desejos ambiciosos que nem se davam por conta dela. Nem com todas as conquistas da inteligência tinham descoberto um meio de trabalhar menos e viver mais. Agitavam-se na Terra e não se conheciam uns aos outros, não se amavam como deviam. A competição os transformou em inimigos. E havia muitos séculos, tinham crucificado um profeta que se esforçava por lhes mostrar que eles eram irmãos, apenas e sempre irmãos.”

Érico Veríssimo

Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana

RESUMO

Avaliou-se através de múltiplos biomarcadores as condições do Rio do Campo, no noroeste do Paraná, em um ponto submetido somente a poluição agrícola, a montante de uma região urbana; um segundo ponto a jusante desta cidade neste mesmo rio, sujeito a poluição urbana, industrial e de efluentes da estação de tratamento de esgoto municipal; e compará-los com um ponto referência em uma reserva biológica (Rebio). Usaram-se como bioindicadores peixes da espécie *Astyanax* aff. *paranae* coletados em julho 2011 (inverno) e novembro de 2011 (verão). O teste do micronúcleo pisco mostrou as maiores frequências de alterações na Rebio durante o verão. O ponto a jusante da cidade em ambas as estações mostrou valores de dano altos quando comparados ao menor valor encontrado na Rebio no inverno. O ponto a montante mostrou valores intermediários. O ensaio cometa sanguíneo revelou taxas de dano semelhantes nos pontos à jusante e à montante da cidade, significativamente maiores do que as da Rebio. O ensaio cometa branquial mostrou menor taxa de danos na Rebio durante o verão, diferindo nesta estação dos pontos antropizados. No ensaio cometa realizado com hepatócitos notou-se que as menores frequências de danos na Rebio, para ambas as estações. Para este biomarcador, o ponto após a estação de tratamento de esgoto no verão mostrou uma taxa de dano significativamente maior que todos os outros pontos amostrais. O índice histopatológico branquial mostrou o menor valor na Rebio e o maior valor a jusante da cidade. As principais alterações histológicas branquiais foram fusão lamelar e hiperplasia, seguidas de descolamento do epitélio, aneurisma e hipertrofia lamelar. O índice histopatológico do fígado apresentou resultados semelhantes aos observados pelo ensaio cometa sanguíneo. Entre as alterações histológicas hepáticas mais frequentes estão principalmente a vacuolização e formação de centro de melanomacrófagos, seguidas de necrose em proporções moderadas e alguns melanomacrófagos livres. Nos biomarcadores bioquímicos, encontrou-se uma redução na atividade da enzima Glutathione-S-Transferase nos pontos antropizados, com o menor valor encontrado na região agrícola. Esta enzima também se mostrou inibida no verão em comparação com o inverno. Para a catalase, não houve uma tendência clara na atividade enzimática e para lipoperoxidação houve um aumento no ponto a jusante durante o verão. Observou-se um decréscimo nos valores de acetilcolinesterase cerebral durante o verão nos pontos antropizados em comparação com a Rebio. A mesma tendência foi vista na acetilcolinesterase muscular. Observou-se uma tendência geral, onde as maiores alterações nos biomarcadores foram encontradas no ponto a jusante da zona urbana, o que pode ser causado pelos resíduos residenciais, urbanos e pelo efluente proveniente da estação de tratamento de esgoto municipal. O local a montante da cidade, circundado por áreas agrícolas apresentou resultados semelhantes aos da jusante, ou intermediários entre este e o local referência na Rebio. As alterações a montante podem ser atribuídas aos pesticidas usados na lavoura.

Palavras-chave: *Astyanax* aff. *paranae*. Biomonitoramento. Ecotoxicologia. Efluentes urbanos. Estação de tratamento de esgoto. Pesticidas.

Multibiomarkers application on fish in assessment of aquatic contamination in agricultural and urban influence sites

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess through multibiomarkers the river condition in a subjected site to agricultural pollution, upstream of a city; a second site downstream of this city, subjected to urban, industrial and sewage plants effluents; and to compare them to a reference site in a Biological Reserve (Rebio). Fishes of *Astyanax* aff. *paranae* specie were used as bioindicators, sampled in July 2011 (winter) and November 2011 (summer). The piscine micronucleus test showed the highest alteration rate in Rebio during summer. Downstream site in both season showed high value in comparison with the lowest value found in Rebio winter. The upstream site show intermediated values. After that, the high damage rate was observed in downstream site during both seasons, followed in the upstream site. The comet assay with blood showed similar damage rate in anthropogenic sites, which are higher than that in Rebio. The comet assay with gill presented the lowest damage rate in Rebio on summer, being significantly smaller than the other sites. In comet assay with liver tissue were observed in Rebio summer the smallest DNA damage, followed by the damage seen in this same site in winter. To this biomarker, downstream site presented the highest DNA damage. The histopathological index of gill had the lowest value in Rebio and the highest in downstream. The main histological changes were lamellar fusion and hyperplasia, epithelium detachment, aneurysm and lamellar hypertrophy. The histopathological index of liver shows similar results to those observed by comet assay with blood. Among the more frequent hepatic alterations were observed vacuolization and melanomacrophages centers, moderated proportions of necrosis and some free melanomacrophages. In biochemical biomarkers, was observed a reduction in Gluthatione-S-Transferase activity in anthropogenic sites, with the smallest value in agricultural region. This enzyme also presented inhibition on summer when compared on winter. Catalase did not present a clear trend in enzymatic activity and lipoperoxidation was increased in downstream site during summer. The brain acetylcholinesterase has decreased on summer in anthropogenic sites relative to Rebio. The same trend was observed in muscle acetylcholinesterase. Summarizing the results, there was a general trend, with the highest changes in biomarkers in downstream site. It can be attributed to residential, urban and sewage treatment plan discharges. The upstream city site, surrounded by agricultural areas presented similar results to downstream, or intermediary to downstream and Rebio. The damages in this site can be attributed to pesticides used in crop farming.

Keywords: *Astyanax* aff. *paranae*. Biomonitoring. Ecotoxicology. Urban Wastewaters. Sewage Treatment Plant. Pesticides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2 UMA ABORDAGEM DE MULTIBIOMARCADORES USANDO *Astyanax aff. paranae* (Pisces: Characidae) PARA MONITORAR DIFERENTES AMBIENTES ANTROPIZADOS.....19

Fig. 1. Área de coleta no centro-noroeste do estado do Paraná, Brasil. MP: ponto no rio do Campo, a montante da cidade de Campo Mourão; JP: ponto no rio do Campo a jusante da cidade. RE: Córrego Concórdia da Rebio das Perobas, município de Tuneiras do Oeste. 22

Fig. 2. Resultados para Ensaio cometa (A.) e Histopatologia (B.) em fígado de *Astyanax aff. paranae* coletados na Reserva Biológica das Perobas (Rebio), a Montante (Upstream) e a Jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão, PR, Brasil durante o inverno (winter) e verão (summer). F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes (a, b e c) representam diferença significativa no teste de Tukey, $p < 0,05$. CI: intervalo de confiança. 28

Fig. 3. Histopatologias em fígado de *Astyanax aff. paranae*. A, B (aumento de 200X) e C (400X): centros de melanomacrófagos (setas) geralmente se concentrando em vasos sanguíneos. D (100X): vacuolização espaçando o tecido hepático (vc e setas pequenas). E (100X): inflamação demonstrada pela concentração de leucócitos (*). F(100X): tecido lesionado apresentando porções necróticas(*). 29

Fig. 4. Atividades das enzimas Glutathione-S-transferase – GST (A.) e Catalase – CAT (B.) mensuradas em *Astyanax aff. paranae* coletados na Rebio, e no rio do Campo a montante (Upstream) e jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão durante o inverno (winter) e verão (summer). F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes (a, b e c) representam diferença significativa no teste Tukey, $p < 0,05$. C.I.: intervalo de confiança. 30

Fig. 5. Medidas da peroxidação lipídica (LPO) em *Astyanax aff. paranae* coletados na Rebio, e no rio do Campo a montante (Upstream) e jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão durante o inverno (winter) e verão (summer). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b, c) representam diferença significativa; ? grupo não testado estatisticamente, $p < 0,05$ 30

Fig. 6. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) mensurados no cérebro (A) e músculo (B) de *Astyanax aff. paranae* coletados na Rebio, e no rio do Campo a montante (Upstream) e jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão no inverno (winter) e verão (summer). F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes sobre as barras (a,b, *) representam diferença significativa no teste de Tukey, $p < 0,05$. C.I.: intervalo de confiança. 31

3 AVALIAÇÃO *IN SITU* DE UM RIO RECEPTOR DE EFLUENTES AGRÍCOLAS E URBANOS, ATRAVÉS DO USO DE MULTIBIOMARCADORES EM PEIXE NEOTROPICAL.....44

Fig. 1 Área de coleta no centro-noroeste do estado do Paraná, Brasil. MP: ponto no rio do Campo, a montante da cidade de Campo Mourão; JP: ponto no rio do Campo a jusante da cidade, RE: Córrego Concórdia da REBIO das Perobas, município de Tuneiras do Oeste..... 45

Fig. 2 Biomarcadores testados em *Astyanax* aff. *paranae* coletados na Reserva Biológica das Perobas (Rebio), a Montante (Upstream) e a Jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão (PR) durante o inverno (winter) e verão (summer) . F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes (a, b, c,**) representam diferença significativa no teste de Tukey, $p < 0,05$. I.C.: intervalo de confiança. 49

Fig. 3 Brânquias de *Astyanax* aff. *paranae*. A Lamelas normais; B (seta) aneurisma; C parasita; D local de implantação parasítica; E tumor benigno, observar infiltração de leucócitos (cabeça de seta); F fusão total das lamelas e hiperplasia. Nota: barra = 20 μ m. 50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AChE – Acetilcolinesterase
aff. – *affinis*
Alfac – Alcool-Formol-ácido acético
ATC – Iodeto de Acetiltiocolina
BHT – hidroxitolueno butilato
CAT – Catalase
CDNB – (1-cloro-2,4-dinitro-benzeno)
ChE – Colinesterase
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DQO – Demanda Química de Oxigênio
DTNB – (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico))
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
GSH – glutationa reduzida
GST – Glutaciona-S- Transferase
ICMBio – Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade
LPO – lipoperoxidação, peroxidação lipídica
MNP – Micronúcleo Písceo
Nupelia – Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura.
OD – Oxigênio dissolvido
REBIO – Reserva Biológica
SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação
Tris - tris(hidroximetil)aminometano
USEPA- United States Environmental Protection Agency
UV – Ultravioleta

°C – graus Celsius
µm – micrômetro
Fe⁺² – íon ferroso
Fe⁺³ – íon férrico
h – hora
M – molar
mg – miligrama
min – minuto
mL – microlitro
mM – milimolar
nm – nanômetro
nmol – nanomol
pH – potencial hidrogeniônico
xg – rotação a x gravidades

Tese elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas
Chemosphere, ISSN: 0045-6535. Disponível em:
<http://www.elsevier.com/journals/chemosphere/0045-6535/guide-for-authors>

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, ISSN: 1432-0800 (electronic
version). Disponível em:
<http://www.springer.com/environment/pollution+and+remediation/journal/128>

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 15 |
| REFERÊNCIAS | 17 |
| 2 UMA ABORDAGEM DE MULTIBIOMARCADORES USANDO <i>Astyanax aff. paranae</i> (Pisces: Characidae) PARA MONITORAR DIFERENTES AMBIENTES ANTROPIZADOS..... | 19 |
| 2.1 INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 2.2.1 Caracterização dos locais de amostragem..... | 21 |
| 2.2.2 Coleta de <i>A. aff. paranae</i> e dados físicos e químicos do ambiente | 23 |
| 2.2.3 Ensaio Cometa de Fígado | 24 |
| 2.2.4 Histopatologia de Fígado | 24 |
| 2.2.5 Biomarcadores Bioquímicos..... | 24 |
| 2.2.6. Análise Estatística..... | 26 |
| 2.3 RESULTADOS | 27 |
| 2.4 DISCUSSÃO | 31 |
| 2.5 CONCLUSÃO..... | 36 |
| REFERÊNCIAS | 37 |
| 3 AVALIAÇÃO <i>IN SITU</i> DE UM RIO RECEPTOR DE EFLUENTES AGRÍCOLAS E URBANOS, ATRAVÉS DO USO DE MULTIBIOMARCADORES EM PEIXE NEOTROPICAL | 43 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 43 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 44 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 46 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 55 |
| ANEXO A – Licença de Coleta de Fauna Silvestre: | 56 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A biota aquática é exposta frequentemente a uma vasta quantidade de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes de emissão (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, processos de drenagem agrícola, derrames acidentais de produtos químicos e esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos, entre outros (RASHED, 2001).

Particularmente, são bem documentados os efeitos tóxicos sobre organismos causados por pesticidas (GHISI; CESTARI, 2013; GHISI *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2011; SHARBIDRE *et al.*, 2011; XING *et al.*, 2012) e efluentes urbanos tal qual descargas de estação de tratamento de esgoto (ABDEL-MONEIM *et al.*, 2012; AKAISHI *et al.*, 2007; ALBERTO *et al.*, 2005; DYK *et al.*, 2012). Estes produtos são capazes de interagir com os organismos vivos causando múltiplas alterações que podem gerar graves consequências em indivíduos, populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (JESUS; CARVALHO, 2008).

As comunidades biológicas refletem a integridade ecológica total dos ecossistemas (p. ex., integridade física, química e biológica), associando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo uma medida agregada dos impactos. As comunidades biológicas de ecossistemas aquáticos são formadas por organismos que apresentam adaptações evolutivas a determinadas condições ambientais e possuem limites de tolerância a diferentes alterações das mesmas (ALBA-TERCEDOR, 1996). Desta forma, o monitoramento biológico constitui-se uma ferramenta útil na avaliação das respostas destas comunidades biológicas a modificações nas condições ambientais originais.

Para se avaliar os efeitos adversos das misturas complexas de substâncias lançadas sobre um ambiente aquático, há uma tendência global de complementar parâmetros físicos e químicos, que permitem uma caracterização momentânea do ambiente, com as respostas obtidas de organismos neste ambiente, realizando-se assim programas de monitoramento *in situ* (AU, 2004; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Os peixes têm atraído muita atenção no biomonitoramento da poluição aquática, devido às suas características biológicas específicas: são abundantes, de tamanho relativamente grande, de fácil identificação taxonômica, se distribuem em todos os níveis tróficos e, portanto, sofrem bioacumulação e biomagnificação, e apresentam alto valor de

consciência pública (ZHOU *et al.*, 2008). Além disso, são importantes veículos de transferência de contaminantes do ambiente aquático a populações humanas (AL-SABTI, 1986).

No organismo aquático escolhido como bioindicador de poluição, podem ser mensuradas respostas em vários níveis de organização: molecular, celular, tissular, sistêmica, de organismo ou níveis mais elevados, com efeitos de resposta mais tardios tomando proporções populacionais e até ecossistêmicas. Estas respostas em níveis individuais são denominadas biomarcadores, e são sinais precoces que refletem efeitos biológicos adversos frente a toxicantes ambientais antropogênicas (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Como a contaminação nos ecossistemas aquáticos é frequentemente difusa, observada como uma mistura complexa de poluentes, é importante a associação de vários biomarcadores, a fim de minimizar os erros de interpretação (FLAMMARION *et al.*, 2002). Entre os biomarcadores mais utilizados em peixes estão os genéticos, bioquímicos e histológicos.

Avaliou-se o estado de um corpo hídrico em três pontos, o primeiro sujeito a efluentes agrícolas e o segundo sujeito a poluição urbana e efluentes da estação de tratamento de esgoto municipal, comparados com um terceiro ponto pouco antropizado, situado em uma Reserva Biológica. Para atingir tal objetivo, foram utilizados como biomarcadores genéticos o teste do micronúcleo pisco (juntamente com a taxa de alterações morfológicas nucleares), que quantificam mutagenicidade e citotoxicidade; e o ensaio cometa que infere sobre efeitos genotóxicos, realizado com sangue, fígado e tecido branquial. Além disso, biomarcadores bioquímicos também foram utilizados, registrando-se a atividade das enzimas Glutathione-S-Transferase, catalase, lipoperoxidação, e mensuração das enzimas acetilcolinesterase cerebral e muscular. Em um nível de organização superior, usou-se também o índice de Bernet para quantificar alterações histopatológicas em fígado e brânquia. Todos estes biomarcadores são mais bem detalhados nos capítulos seguintes.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A. M.; AL-KAHTANI, M. A.; ELMENSHAWY, O. M. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 1028–1035, 2012.
- AKAISHI, F. M.; ST-JEAN, S. D.; BISHAY, F.; CLARKE, J. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. **Aquatic Toxicology**, v. 82, p. 1–14, 2007.
- ALBA-TERCEDOR, J. **Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. IV Simposio del Agua en Andalucía (SIAGA)**. Anais... Almeria: vol. II: 203-213, 1996. Disponível em: http://www.ephemeroptera-galactica.com/pubs/pub_a/pubal baj1996p203.pdf, Acesso em 20 nov 2013.
- ALBERTO, A.; CAMARGO, A. F. M.; VERANI, J. R.; COSTA, O. F. T.; FERNANDES, M. N. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 2, p. 247–55, jun 2005.
- AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85 C, n. 1, p. 5–9, 1986.
- AU, D. W. T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 9-10, p. 817–34, 2004.
- DYK, J. C. VAN; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharp-tooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 301–311, 2012.
- FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; et al. Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 145–153, 2002.
- GHSI, N. C.; CESTARI, M. M.; ALMEIDA, M. I. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term environmentally low concentration exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 4, p. 3201–3207, 2013.
- GHSI, N. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1-4, p. 589–99, set 2011.
- JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 680–693, 2008.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, v. 27, n. 1, p. 27–33, jul 2001.

ROSSI, S. C.; PIANCINI, L. D. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, p. 603–607, 2011.

SHARBIDRE, A. A.; METKARI, V.; PATODE, P. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 132–141, 2011.

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, n. 2, p. 57–149, fev 2003.

XING, H.; LI, S.; WANG, Z.; et al. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 377–83, jul 2012.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135–50, 14 jan 2008.

2 UMA ABORDAGEM DE MULTIBIOMARCADORES USANDO *Astyanax aff. paranae* (Pisces: Characidae) PARA MONITORAR DIFERENTES AMBIENTES ANTROPIZADOS

Nédia C. Ghisi^a, Elton C. Oliveira^b, Izonete C. Guiloski^c, Helena C. Silva de Assis^c, Alberto J. Prioli^a

^aPrograma de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais (PEA)/Nupelia, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Av Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900, Maringá (PR) Brasil. nediaghisi@gmail.com; ajprioli@nupelia.uem.br

^bUniversidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Estrada para Boa Esperança, km 4, 85660-000, Dois Vizinhos (PR) Brazil. elton.c.oliveira2@gmail.com

^c Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Coronel Fco H. dos Santos, s/n, 81531-990, PO box 19031, Curitiba (PR) Brasil. guiloski@ig.com.br; helassis@ufpr.br

Resumo

As abordagens com múltiplos biomarcadores têm sido utilizadas como uma ferramenta efetiva para quantificar o risco ambiental de poluentes. Avaliou-se o peixe neotropical *Astyanax aff. paranae*, amostrado durante duas estações do ano em três locais com diferentes níveis de poluição: uma reserva biológica, protegida pelo governo brasileiro; um local circundado por áreas agrícolas, em uma das regiões mais produtivas do Brasil; e um ponto a jusante de uma cidade nesta mesma região, em rio receptor de efluentes urbanos, caracterizado por um forte impacto antropogênico, logo após a estação de tratamento de esgoto municipal. Com o objetivo de comparar estes diferentes locais quanto aos danos causados pela poluição, fez-se uso dos seguintes biomarcadores: ensaio cometa e análise histopatológica de fígado; enzimas hepáticas Glutathione-S-Transferase (GST), catalase (CAT) e lipoperoxidação (LPO) e; acetilcolinesterase cerebral e muscular. Os resultados fornecem evidências de diferenças significativas nos parâmetros entre indivíduos coletados nos três locais, apresentando-se de forma geral o local a jusante da cidade como o mais alterado, seguido pela região agrícola.

Palavras-chave: Biomarcadores Bioquímicos; Ensaio Cometa; Esgoto; Histopatologia; Pesticidas; Peixe.

2.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a água constitui um fator limitante para o desenvolvimento agrícola, urbano e industrial, considerando-se que a disponibilidade *per capita* de água doce vem sendo reduzida rapidamente, diante do aumento gradativo na demanda para seus múltiplos usos e da contínua poluição dos mananciais ainda disponíveis (Sautchuk et al., 2005). A poluição da água pode ser originada por diversos fatores: esgoto industrial, efluentes domésticos, fertilizantes e agrotóxicos usados na agricultura, etc. A água é um recurso extremamente valioso. Sua contaminação é muito fácil, mas o mesmo não pode se dizer de sua descontaminação, a qual muitas vezes é dispendiosa e em alguns casos impossível de ser executada (Towsend et al., 2006).

O Brasil possui um extenso sistema fluvial, correspondendo a aproximadamente 18% da água doce disponível na superfície do planeta e, no Brasil 90% dessas áreas estão localizadas em regiões de baixa densidade populacional (Setti et al., 2000). Na região sul do Brasil, o estado do Paraná, em especial a região norte se destaca por uma extensiva produção agrícola, e por possuir algumas cidades de porte médio, que se concentram basicamente em torno de corpos hídricos.

Neste sentido, a avaliação do risco potencial de contaminação para biota aquática e populações humanas que fazem uso destes corpos hídricos, é frequentemente executada através de programas de biomonitoramento. Em geral, peixes são escolhidos como sentinelas para monitorar a qualidade da água, pois vivem imersos na água, ocupam diferentes posições tróficas, e são importantes fontes de exposição a contaminantes para populações humanas (Oliveira Ribeiro et al., 2005; Rabitto et al., 2011). Particularmente peixes do gênero *Astyanax* são muito utilizados como bioindicadores em estudos de monitoramentos e ensaios toxicológicos, pois são abundantes no sul do Brasil, têm hábito onívoro, são de fácil captura, tamanho e resistência adequados às condições laboratoriais (Alberto et al., 2005; Carrasco-Letelier et al., 2006; Lemos et al., 2008)

Para biomonitoramento e manejo de ecossistemas aquáticos continentais, vários biomarcadores têm sido propostos para complementar as informações dadas por análises químicas, que muitas vezes são pouco responsivas (Lobo et al., 2002). A contaminação no ambiente aquático é frequentemente observada como uma mistura complexa de poluentes. Por esta razão, o uso concomitante de vários biomarcadores é importante, pois minimiza grandemente os erros de interpretação (Flammarion et al., 2002).

Entre estes biomarcadores, destaca-se o ensaio cometa (ou *single-cell gel electrophoresis assay*) que detecta quebras em fita única de DNA. Com este teste, efeitos de poluentes sobre a integridade do DNA têm sido muito bem reportados em animais aquáticos, especialmente em peixes (Cavalcante et al., 2008; Çavas and Könen, 2007; Flammarion et al., 2002; Frenzilli et al., 2009). Devido a sua alta sensibilidade, biomarcadores bioquímicos também são muito utilizados por identificarem alterações agudas nos processos celulares que podem levar a efeitos fisiológicos mesmo em baixas concentrações de xenobióticos (Stegeman et al., 1993; Al-Ghais, 2013). A avaliação da atividade de enzimas tal qual catalase (CAT, antioxidante), Glutathione-S-transferase (GST, enzima de biotransformação da fase II), e colinesterase (AChE, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina), além da peroxidação lipídica (LPO) tem sido usada tanto em experimentos laboratoriais (Bussolaro et al., 2008; Modesto and Martinez, 2010; Rossi et al., 2011; Xing et al., 2012) como em biomonitoramentos (Brito et al., 2012; Silva et al., 2009). As alterações de respostas de CAT, GST e LPO têm sido observadas em peixes expostos a contaminantes orgânicos e metais tóxicos (Akaishi et al., 2004; Rabitto et al., 2011, 2005; Silva et al., 2009). Biomarcadores histopatológicos também representam uma ferramenta muito útil para avaliar diferentes classes de agentes poluidores, particularmente aquelas relativas a efeitos subletais e crônicos em tecidos. Entre os tecidos de interesse destaca-se o fígado, pois é o principal órgão responsável pelo metabolismo de substâncias tóxicas incluindo xenobióticos (Fanta et al., 2003)

Assim, o objetivo foi avaliar *in situ* dois locais com diferentes tipos e níveis de poluição urbana e agrícola, em comparação com um local de referência pouco antropizado, através de uma abordagem com múltiplos biomarcadores, durante as estações de inverno e verão, usando o peixe *A. aff. paranae* como bioindicador.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Caracterização dos locais de amostragem

O município de Campo Mourão localiza-se no centro-noroeste do Estado de Paraná (PR), Brasil. Possui cerca de 90 mil habitantes, com economia essencialmente agrícola. Destaca-se pela expressiva produção de grãos, especialmente soja e milho, propiciada pelo relevo plano e solos profundos, que favorecem o desenvolvimento da agricultura mecanizada e a alta produtividade. A agricultura ocupa 83,58% da área do município, que sedia a maior cooperativa agrícola do Brasil e a

terceira maior do mundo e outras empresas de grande porte. Essa condição favorável para o uso intensivo do solo tem levado ao declínio quanto à conservação do mesmo, sendo que práticas inadequadas que favorecem a erosão ainda são comuns na região (Mizote, 2008).

Neste município foram determinados dois pontos amostrais no principal corpo hídrico de abastecimento da cidade, o Rio do Campo: MP localiza-se a montante da cidade de Campo Mourão, cercado apenas por áreas agrícolas, não atravessando regiões urbanas nem industriais; (JP) situa-se a jusante da região urbana, caracteriza-se pela descarga de diferentes efluentes da cidade, incluindo despejos industriais. JP localizou-se logo após a estação de tratamento de esgoto municipal, recebendo todos os efluentes deste local (Fig. 1). Existe uma barreira física artificial separando os dois pontos– um represamento artificial para formação de um lago, o que impede a migração dos indivíduos entre os locais.

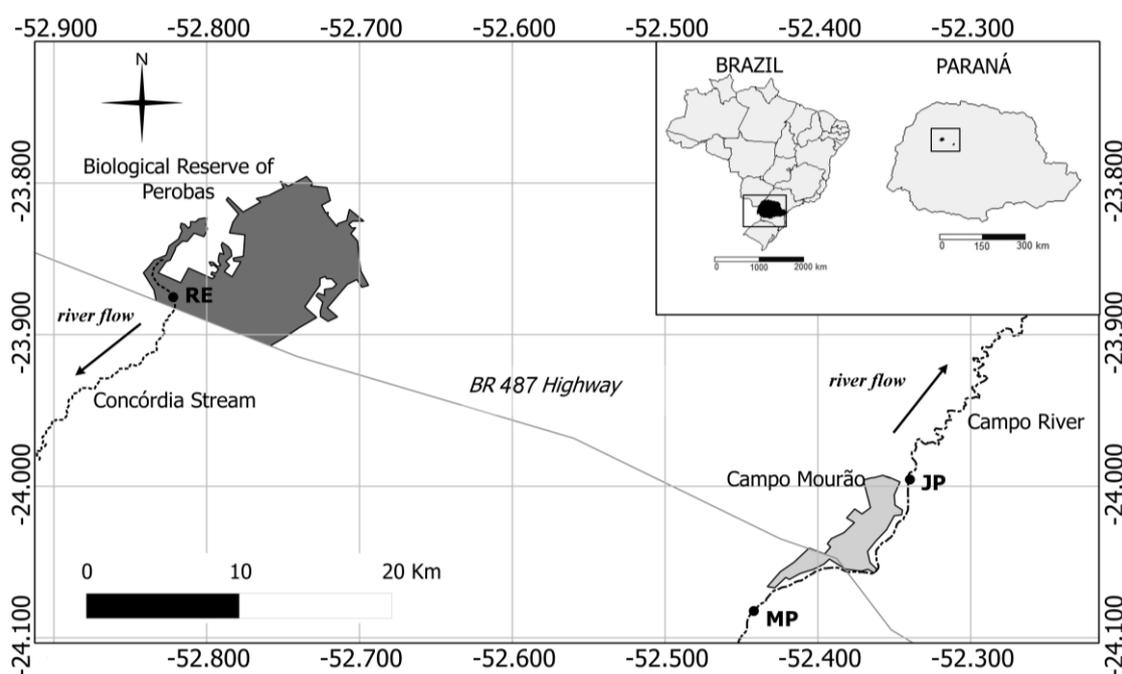


Fig. 1. Área de coleta no centro-noroeste do estado do Paraná, Brasil. MP: ponto amostral no rio do Campo, a montante da cidade de Campo Mourão; JP: ponto amostral no rio do Campo a jusante da cidade. RE: Córrego Concórdia da Rebio das Perobas, município de Tuneiras do Oeste.

Em contraste, o córrego Concórdia (RE) é um riacho localizado na zona de amortecimento da Reserva Biológica das Perobas (Rebio), caracterizado por menor nível de antropização e, desta forma, considerado como controle negativo. Reserva Biológica é uma categoria de unidade de conservação no Brasil que tem como objetivo a preservação integral da biota e demais atributos

naturais existentes em seus limites, sem interferência humana direta ou modificações ambientais, excetuando-se as medidas de recuperação de seus ecossistemas alterados e as ações de manejo necessárias para recuperar e preservar o equilíbrio natural, a diversidade biológica e os processos ecológicos naturais (Brasil, 2000). A Reserva das Perobas possui 8.176 hectares, e localiza-se nos municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte, noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil (Silva e Filho, 2011). A área é caracterizada pelo contato entre a Floresta Estacional Semidecidual Submontana (onde predominam perobas) e a Floresta Ombrófila Mista (onde se destacam as araucárias) (Castella e Britez, 2004). Assim, esta reserva contém ambientes diferentes dentro de uma mesma área.

2.2.2 Coleta de *A. aff. paranae* e dados físicos e químicos do ambiente

No momento da coleta dos peixes, foram tomadas as medidas de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e pH, com o auxílio de uma sonda multiparâmetros (marca: Hanna, modelo: HI 9828) e amostras de água foram coletadas e preservadas em gelo para posterior análise de componentes específicos: demanda química de oxigênio (DQO), fósforo, nitrogênio, cobre, alumínio e zinco mensurados segundo as metodologias Standard Methods (APHA -AWW - WEF, 2005), no laboratório de química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Campo Mourão).

Os peixes foram capturados com petrechos apropriados para coleta (rede de espera e peneira). Realizou-se a coleta de aproximadamente 20 indivíduos de *A. aff. paranae* em cada ponto amostral durante duas estações – inverno (julho/2011) e verão (novembro/2011). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o guia para uso e proteção do bem estar de animais em Laboratório (seguindo o *Canadian Council on Animal Care*). Os animais capturados foram transportados ao laboratório e anestesiados com benzocaína 20% para retirada do fígado, cérebro e porções de músculo.

Exemplares *vouchers* foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) sob o nº de lote: montante e jusante NUP 13381 e Field: NCG2011103101; e Reserva: NUP13382 e Field NCG2011071701. O projeto teve autorização do órgão federal competente para coleta de fauna selvagem (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio licença nº 25129-1 – Anexo A).

2.2.3 Ensaio Cometa de Fígado

O ensaio cometa foi realizado com tecido hepático lavado em solução fisiológica e desagregado com um micro homogeneizador, adaptando o protocolo de Ferraro et al. (2004). Analisaram-se 100 nucleoides de cada peixe, usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, adotando-se as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo, apoptose). O escore foi calculado multiplicando o número de núcleos encontrado em dada classe pelo valor da classe.

2.2.4 Histopatologia de Fígado

Para análise histopatológica, porções de fígado foram fixadas em Alfac (85 mL de etanol 80%; 10 mL de formol 40%; 5 mL de ácido acético glacial por 100 mL de solução) por 12 horas. Posteriormente, o fígado foi desidratado em séries graduais de banhos de etanol e emblocado em Paraplast Plus (Sigma®). Secções de 5 µm foram fixadas em lâmina, coradas com Hematoxilina/Eosina e observadas em fotomicroscópio. Usou-se o critério de Bernet et al. (1999) para classificação dos danos histopatológicos e obtenção do índice de Bernet.

2.2.5 Biomarcadores Bioquímicos

Amostras de tecido hepático, músculo e cérebro foram acondicionadas em criotubos identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente destinaram-se às análises bioquímicas das enzimas GST, CAT e LPO (fígado) e acetilcolinesterase (músculo e cérebro). Para a preparação das enzimas do fígado, as amostras foram descongeladas em temperatura de 4°C e homogeneizadas (*pool* de três animais) em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, com auxílio do homogeneizador automático, na proporção 1:10 (peso do tecido/volume do tampão). O homogeneizado utilizado como fonte de enzimas foi obtido pela centrifugação a 10.000 x g a 4°C, por 30 minutos. Do sobrenadante (fração S9) foram retiradas alíquotas para análise da GST, CAT, LPO e para dosagem de proteína.

2.2.5.1 *Glutathione-S-transferase (GST)*:

O método baseia-se no trabalho proposto por Habig et al. (1974) e Habig e Jakoby (1981). As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitro-benzeno), com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância, através da leitura em microplacas. O sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:10 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5; após, 100 µL deste foram pipetados nas microplacas. Em

seguida, foram adicionados 200 μL de solução reação (CDNB 2,5 mM, GSH 2 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5) para realização imediata da leitura (quatro réplicas de cada amostra). O aumento linear da absorbância, a 340 nm, foi monitorado e a atividade foi expressa em nmoles de conjugado GSH-CDNB produzido por minuto, por miligrama de proteína, em espectrofotômetro de microplaca Sunrise – TECAN. A atividade enzimática é expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$.

2.2.5.2 *Catalase (CAT)*:

Para a atividade da catalase, o sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:5 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1 M pH 6,5. As amostras de enzima foram pipetadas em cubetas de quartzo (10 μL). Em seguida, foram adicionados 990 μL de solução reação 20 mM (Tampão Tris 1 M/EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água Milli-Q, em concentrações específicas e mantida em banho-maria a 25°C). Foram lidas três réplicas de cada amostra. O método consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria (Aebi, 1984). O aumento linear da absorbância foi monitorado em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, UV/Visible - Pharmacia Biotec), a 240 nm, por 1 minuto a cada 15 segundos. A atividade enzimática é expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$.

2.2.5.3 *Lipoperoxidação (LPO)*:

A análise da LPO baseia-se no método descrito por Jiang et al. (1992) e Hermes-Lima et al. (1995). A determinação da lipoperoxidação foi feita segundo o ensaio Laranja de Xilenol ou Ensaio FOX modificado, que tem por princípio a rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} -Laranja de xilenol (fonte de absorção de luz), na presença do estabilizador hidroxitolueno butilato (BHT). O sobrenadante inicial foi ressuspenso em metanol PA na proporção 1:2 (volume/volume), sonificado durante 1 minuto e centrifugado 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. Em seguida, 30 μL do sobrenadante dessa última centrifugação foi pipetado em microplacas e incubado por cerca de trinta minutos, com 270 μL de solução reação (metanol 90%, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25 mM, BHT 4 mM, sulfato ferroso amoniacal 250 μM , e laranja de xilenol 1 mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, a 570 nm. O resultado é expresso em equivalentes de CHP (concentração de hidroperóxido) pela quantidade de proteína encontrada na amostra ($\text{nmol}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$).

2.2.5.4 Acetilcolinesterase (AChE):

As amostras de músculo e cérebro foram diluídas a 10% (peso do tecido/volume do tampão) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,5). Pipetou-se 50 µL da fonte de enzima em microplaca, com 200 µL de DTNB (0,75 mM) e 50 µL de ATC (iodeto de acetiltiocolina 9 mM). Foram lidas três réplicas de cada amostra. A atividade da AChE foi medida segundo o método de Ellman et al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O substrato, iodeto de acetiltiocolina, é hidrolizado pela enzima, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) para produzir o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato. A absorbância foi medida a 405 nm, em espectrofotômetro de microplaca, Sunrise – TECAN. Os resultados são expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína⁻¹.

2.2.5.5 Concentração proteica:

Os dados das atividades enzimáticas foram normalizados pelas respectivas concentrações proteicas totais, quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina como padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN).

2.2.6. Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos a testes de pressupostos de normalidade e homocedasticidade, Kolmogorov–Smirnov e Levene, respectivamente. Dados paramétricos foram testados quanto à interação entre os fatores 'estação' e 'local'. No caso de ausência de interação, os dados foram agrupados para um único fator no teste de ANOVA unifatorial. Havendo interação, usou-se ANOVA bifatorial. Diferenças entre grupos foram testadas pelo teste Tukey. Dados não paramétricos foram testados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pela comparação múltipla de ranques médios para todos os grupos. Todos os testes foram realizados com a ajuda do programa Statistica (StatSoft, 2007). O nível de significância considerado foi 5%.

2.3 RESULTADOS

Não foram observadas variações consideráveis entre os dados abióticos, seja na comparação entre estações do ano ou entre diferentes locais. Os maiores valores de DQO foram encontrados a jusante, em ambas as estações do ano (Tabela 1). A presença de materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais foi evidente neste ponto. Juntamente com estes materiais, substâncias que produzem odor e turbidez também foram notadas.

Tabela 1 Parâmetros físico-químicos obtidos da água nos pontos de coleta. NTK=Nitrogênio Total Kjeldahl. DQO= Demanda Química de Oxigênio, OD= Oxigênio dissolvido.

| Características físico-químicas da água (<i>in situ</i>) | Rebio | | Montante | | Jusante | |
|--|---------|-------|----------|-------|---------|-------|
| | inverno | verão | inverno | verão | inverno | verão |
| DQO (mg/L) | 7,491 | 5,948 | 7,063 | 7,807 | 8,922 | 9,665 |
| Oxigênio dissolvido (mg/L) | 8,34 | 5,95 | 7,16 | 6,36 | 7,99 | 5,78 |
| pH | 6,67 | 6,48 | 6,83 | 6,9 | 7,21 | 7,5 |
| Temperatura (°C) | 18,89 | 22,87 | 17 | 18,01 | 17 | 19,92 |
| Condutividade (µS/cm) | 25 | 18 | 40 | 20 | 86 | 42 |
| OD% | - | 73,4 | - | 6,7 | - | 68,1 |
| Alumínio (mg/L) | 0,77 | 0,945 | 0,89 | 1,04 | 0,74 | 0,868 |
| Cobre (µg/L) | 1,6 | 0,5 | 7,3 | 1,9 | 4,0 | 4,2 |
| Zinco (µg/L) | 1,7 | 3,45 | 3,7 | 5,2 | 3,7 | 4,8 |
| NTK (mg/L) | < 0,05 | 0,2 | < 0,05 | 0,05 | < 0,05 | 0,05 |
| Fósforo (mg/L) | 0,0124 | 0,945 | < 0,01 | 0,091 | 0,0183 | 0,054 |

No ensaio cometa realizado com hepatócitos (Fig. 2A) observou-se que os animais da Rebio, durante o verão apresentaram a menor taxa de dano ao DNA, seguidos pelos indivíduos coletados neste mesmo local durante o inverno. A maior taxa de dano foi observada no ponto a jusante da cidade de Campo Mourão. O ponto a montante não diferiu entre estações e foi semelhante ao ponto a jusante no inverno.

Uma tendência semelhante foi evidenciada no índice histopatológico de Bernet para o fígado, que foi testado por ANOVA unifatorial, pois o fator estação não foi significativo (Fig. 2B). Neste, os pontos no rio do Campo (jusante e montante) não diferiram entre si, mas tiveram índice de dano tecidual significativamente maior que o dos indivíduos coletados na Rebio.

Entre as alterações histopatológicas mais frequentes, encontraram-se a vacuolização hepática e formação de centro de melanomacrófagos. Necroses foram vistas em proporções moderadas e alguns poucos melanomacrófagos livres também foram registrados (Fig. 3).

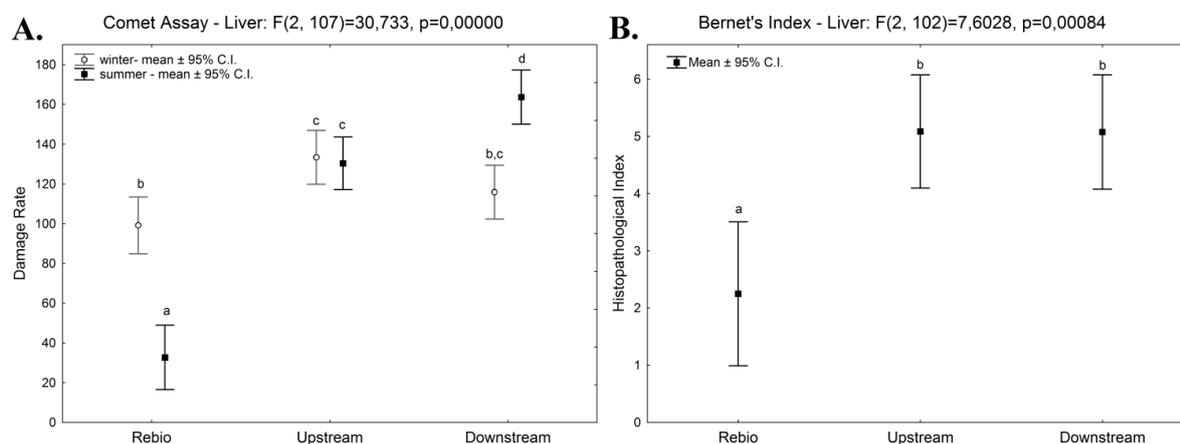


Fig. 2. Resultados para Ensaio cometa (A.) e Histopatologia (B.) em fígado de *Astyanax aff. paranae* coletados na Reserva Biológica das Perobas (Rebio), a Montante (Upstream) e a Jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão, PR, Brasil durante o inverno (winter) e verão (summer). F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes (a, b e c) representam diferença significativa no teste de Tukey, $p < 0,05$. C.I.: intervalo de confiança.

A atividade da enzima GST diferiu significativamente quando se analisou os fatores ponto de coleta e estação isolados. Não houve interação estatística dos referidos fatores (Fig.4 A). Notou-se uma queda significativa nos pontos do rio do Campo, quando comparados com a Rebio. O ponto a montante mostrou a menor atividade para esta enzima. Na comparação entre estações houve uma inibição significativa da GST durante o verão ($p < 0,001$).

A atividade da catalase mostrou interação estatística entre pontos amostrais e estações, sendo assim testado por ANOVA bifatorial ($p = 0,002$). Houve diferença estatisticamente significativa entre os pontos amostrais e estações, mas sem uma tendência clara. As menores e maiores médias foram observadas no ponto a jusante da cidade de Campo Mourão, respectivamente no inverno e no verão (Fig. 4B).

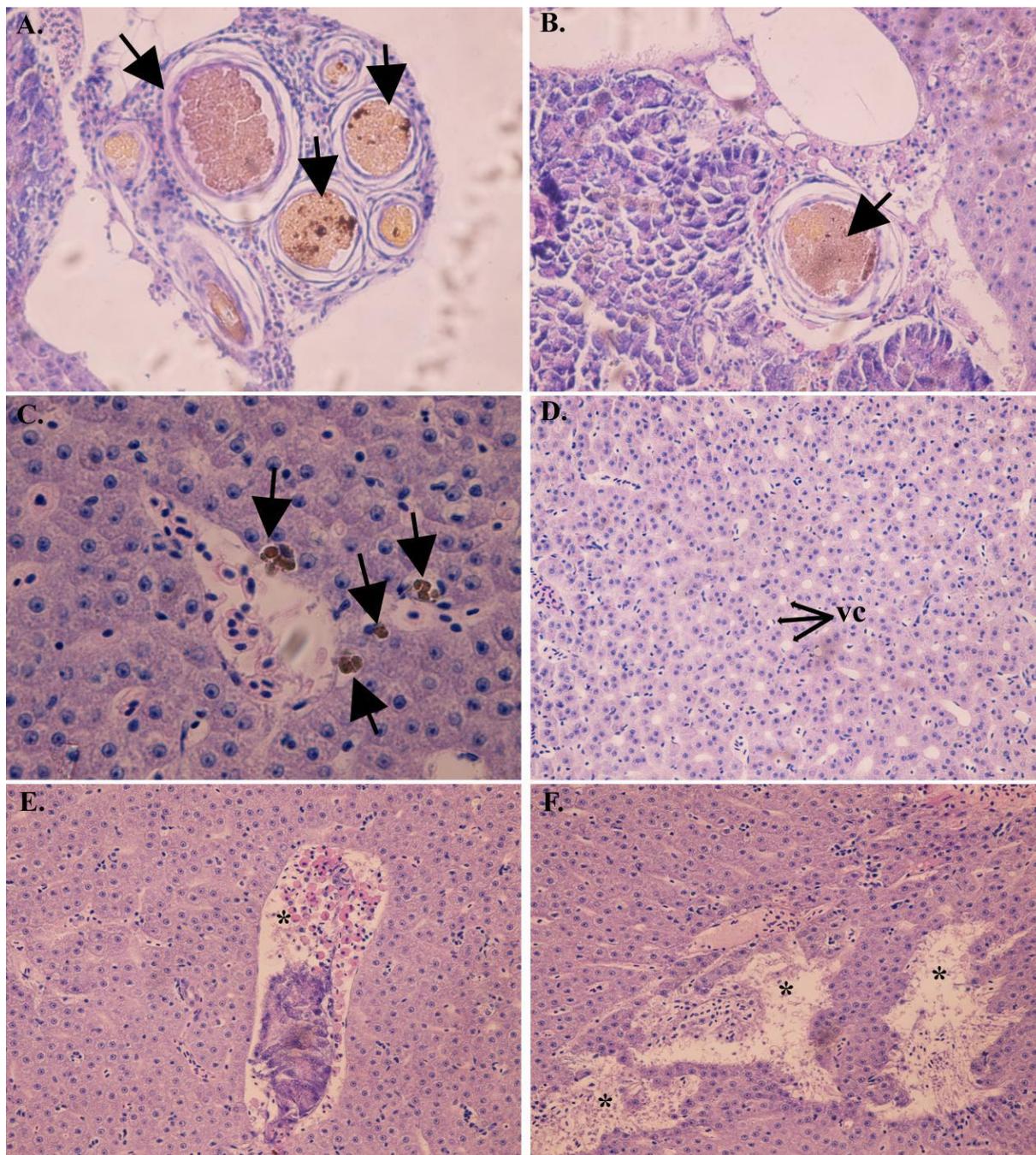


Fig. 3. Histopatologias em fígado de *Astyanax* aff. *paranae*. A, B (aumento de 200X) e C (400X): centros de melanomacrófagos (setas) geralmente se concentrando em vasos sanguíneos. D (100X): vacuolização espaçando o tecido hepático (vc e setas pequenas). E (100X): inflamação demonstrada pela concentração de leucócitos (*). F(100X): tecido lesionado apresentando porções necróticas(*).

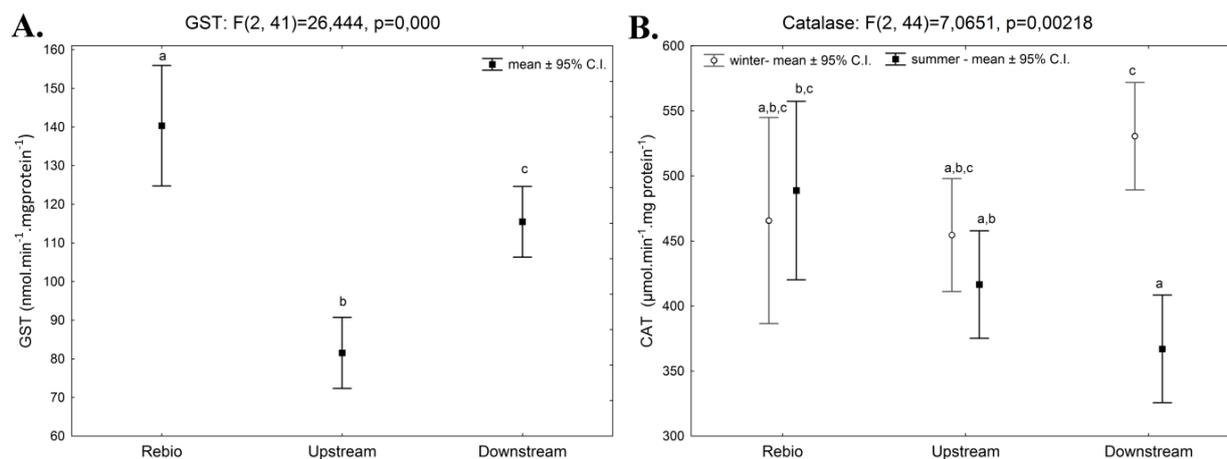


Fig. 4. Atividades das enzimas Glutaciona-S-transferase – GST (A.) e Catalase – CAT (B.) mensuradas em *Astyanax aff. paranae* coletados na Rebio, e no rio do Campo a Montante (Upstream) e Jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão durante o inverno (winter) e verão (summer). F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes (a, b e c) representam diferença significativa no teste Tukey, $p<0,05$. C.I.: intervalo de confiança.

As medidas de lipoperoxidação (LPO) apresentaram problemas amostrais e, portanto alguns grupos do verão não foram representados. As amostras com número amostral suficiente foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis e mostraram diferença significativa. Observou-se um aumento significativo na peroxidação lipídica no ponto a jusante, destacando a maior medida no verão (Fig. 5).

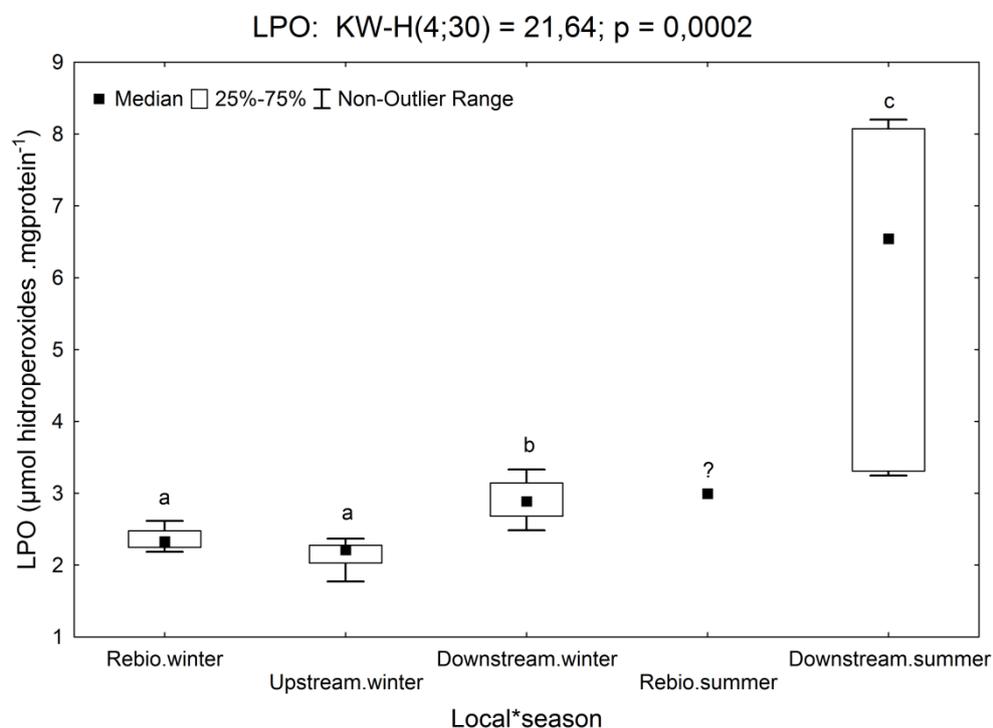


Fig. 5. Medidas da peroxidação lipídica (LPO) em *Astyanax aff. paranae* coletados na Rebio, e no rio do Campo a Montante (Upstream) e Jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão durante o inverno (winter) e verão (summer). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b, c) representam diferença significativa; ? grupo não testado estatisticamente, $p<0,05$.

Para AChE cerebral, observou-se interação entre os fatores estação e local de coleta ($p < 0,001$). Realizou-se, portanto uma ANOVA bifatorial (Fig.6A). Obteve-se o maior valor de AChE na Rebio durante o verão e o menor valor a jusante durante o verão. Durante o inverno, o maior valor foi encontrado no ponto a montante, que foi semelhante àquele observado na Rebio no verão.

Os dados de AChE muscular não mostraram interação entre fatores estação e local de coleta ($p = 0,28$) e somente o fator local foi significativo ($p < 0,001$). Desta forma, na comparação entre os três locais, notou-se o maior valor de AChE na Rebio, com uma diminuição significativa nos pontos do Rio do Campo. Esses dois pontos em Campo Mourão não diferiram entre si (Fig. 6B).

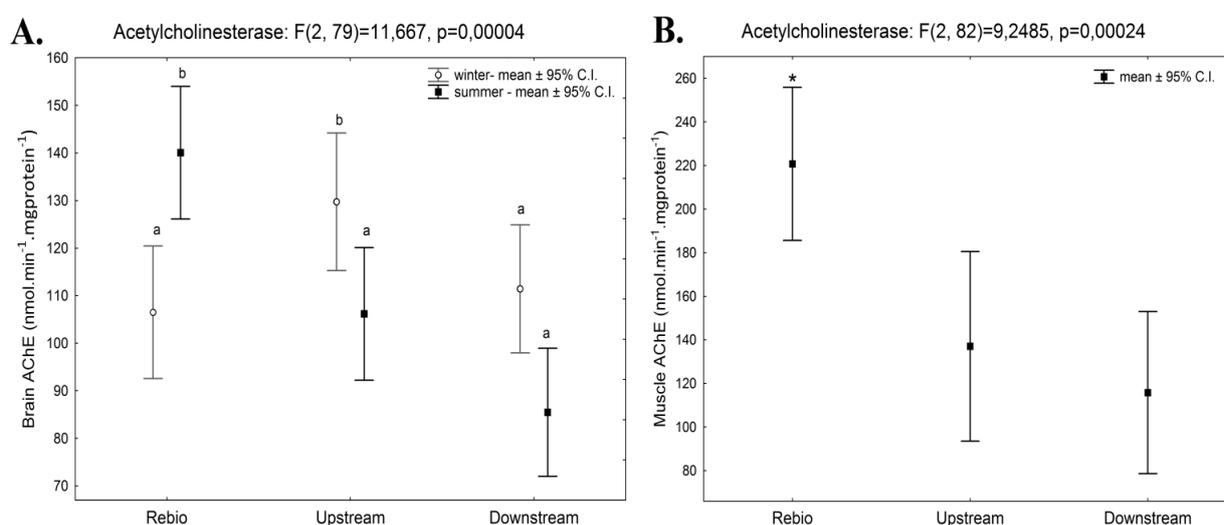


Fig. 6. Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) mensuradas no cérebro (A) e músculo (B) de *Astyanax* aff. *paranae* coletados na Rebio, e no rio do Campo a Montante (Upstream) e Jusante (Downstream) da cidade de Campo Mourão no inverno (winter) e verão (summer). F: Resultado da ANOVA. Letras diferentes sobre as barras (a,b, *) representam diferença significativa no teste de Tukey, $p < 0,05$. C.I.: intervalo de confiança.

2.4 DISCUSSÃO

Compararam-se dois locais em um rio com diferentes influências antrópicas e um local referência (Rebio das Perobas), e obteve como resultado uma tendência geral, onde as maiores alterações nos biomarcadores foram observadas no ponto a jusante da zona urbana, influenciado por esgoto e efluentes industriais. O local a montante da cidade, circundado por áreas agrícolas mostrou um resultado geral semelhante ao da jusante, ou intermediário entre este e o local referência na reserva biológica. A Rebio mostrou-se dentro do prospecto de um local preservado e pouco influenciado por ações antrópicas.

Parâmetros físicos e químicos também foram mensurados, pois permitem uma caracterização do ambiente. Os resultados não variaram consideravelmente entre os pontos e estações. Com exceção do alumínio, nenhum parâmetro ultrapassou os limites permitidos na Resolução CONAMA n° 357 (Brasil, 2005). Os valores para o alumínio em todos os pontos superaram os valores máximos permitidos por esta mesma resolução, mas provavelmente isto se deve ao excesso de alumínio no solo da região (Kohli e Rajaram, 1988).

A Resolução CONAMA n°357 classifica os corpos hídricos superficiais e regulamenta as condições e padrões para o lançamento de efluentes, e estabelece que os efluentes devem estar livres de materiais flutuantes. No entanto, este tipo de material, tal qual espumas, foi visualizado no ponto a jusante, logo após o despejo de efluentes da estação de tratamento de esgoto municipal, nas duas estações coletadas. Este lançamento de efluentes pode relacionar-se com a maior DQO observada neste ponto, também em ambas as estações. Neste local também foram observados os maiores valores de pH, principalmente no verão. A jusante também a condutividade mostrou-se muito elevada no inverno, atingindo mais que o dobro do valor dos outros pontos. A condutividade elétrica da água representa a facilidade ou dificuldade de passagem da eletricidade na água. Os compostos orgânicos e inorgânicos contribuem ou interferem na condutividade, de acordo com sua concentração na amostra. Cada rio ou corpo d' água tende a ter uma gama relativamente consistente de valores de condutividade elétrica que, uma vez conhecidos, podem ser utilizados como base de comparação para medições regulares de condutividade. Desta forma, alterações significativas na condutividade pode indicar que uma descarga ou alguma outra fonte de contaminação tenha entrado no corpo hídrico. Sistema de esgoto com tratamento inadequado tendem a aumentar a condutividade, devido à presença de cloretos, fosfatos e nitratos (USEPA, 2012).

Os parâmetros abióticos são importantes para caracterizar um ambiente, mas tornam-se pouco eficientes em corpos hídricos lóticos, como nos ambientes amostrados, pois a correnteza faz com que a água seja continuamente renovada. Por isto é importante avaliar biomarcadores, que oferecem informações de efeitos ambientais prolongados e refletem estados não mais existentes no momento da verificação, mas ocorridos anteriormente no ecossistema a que os organismos estão submetidos (Lobo et al., 2002). Neste sentido, a resolução supracitada estabelece também que os efluentes lançados em corpos hídricos não devem causar ou possuir potencial para causar efeitos

tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor (Brasil, 2005), e verificou-se que tais efluentes estão afetando negativamente os organismos em nível genético, bioquímico e histológico.

Em nível genético, por meio do ensaio cometa, observou-se a maior taxa de dano ao DNA hepático no ponto a jusante da zona urbana enquanto as menores taxas de dano ao DNA de *A. aff. paranae* foram encontradas na Rebio, com dano intermediário na região agrícola. Esta taxa de dano na região agrícola pode ser explicada principalmente pela presença dos pesticidas utilizados na lavoura. Já são bem reportados os danos que várias classes de pesticidas podem causar ao DNA, a citar os estudos de Cavalcante et al. (2008), Çavas e Könen (2007) e Guilherme et al. (2010) com o herbicida glifosato; Çavas (2011) com o herbicida atrazina e; o estudo de Rossi et al. (2011) que também trabalhou com o peixes *Astyanax* submetidos a glifosato e diuron.

Regiões de alta produtividade agrícola, como é o caso do local deste estudo (Mizote, 2008), demandam grandes quantidades de produtos químicos, sejam herbicidas, fungicidas, inseticidas, óleos minerais ou fertilizantes. Dados fornecidos pela Secretaria de Abastecimento da Região (SEAB Campo Mourão – *pers. comm.*) revelam que para 2011 foram vendidos 862.525,94 Kg de pesticidas somente na cidade de Campo Mourão e 10.923 toneladas para a região, que engloba 23 municípios. Entre estes pesticidas, o líder de vendas em Campo Mourão foi o glifosato com 25,6% (mais de 220 toneladas), seguido pelo metamidofós com 12% das vendas. Óleo mineral, atrazina, clorimuron-etílico e 2,4-D juntos somam 23% das vendas na cidade.

Além de danos ao DNA, os pesticidas também podem afetar o fígado em nível histológico, como mostram os resultados de Fanta et al. (2003) e Jiraungkoorskul et al. (2003). O índice de lesão histopatológica ao fígado em *A. aff. paranae* mostrou-se significativamente elevado, tanto na região agrícola, como no ponto a jusante da zona urbana.

A presença de efluentes industriais e o despejo de efluentes da estação de tratamento de esgoto podem ser responsáveis pela maior taxa de danos ao nível genético e histológico observada no ponto à jusante, principalmente no verão. Nesta época, devido ao maior índice de pluviosidade na região, maiores quantidades de efluentes são dispensadas dos tanques de tratamento. Alguns estudos já demonstraram estes efeitos danosos do esgoto doméstico sobre DNA como Grisolia e Starling (2001), Grisolia et al. (2009) e Wirzinger et al. (2007). A pesquisa desenvolvida por Bucher e Hofer (1993) também corrobora os resultados da histopatologia no ponto a jusante, pois mostra que a exposição ao esgoto tratado de maneira ineficiente causa danos crônicos ao fígado de peixes. Em

outro estudo, Dyk et al. (2012) compararam histologias hepáticas em peixes de locais poluídos e não poluídos, e resultados semelhantes foram encontrados. Em tal estudo, peixes residentes em locais poluídos com resíduos industriais e descargas de estações de tratamento de esgoto mostraram maior prevalência de alterações toxicopáticas e pré-neoplásicas, além de um índice do fígado pior do que aqueles do local referência.

De todas as alterações histológicas encontradas, a vacuolização dos hepatócitos foi a mais recorrente. Esta vacuolização pode resultar em distrofia lipídica, que se acredita ser um estágio pré-necrótico, geralmente observada em peixes expostos a metais pesados (Arellano et al., 1999) e residentes de locais contaminados com uma mistura de xenobióticos (Dyk et al., 2012; Greenfield et al., 2008; Triebkorn et al., 2008). Enquanto o acúmulo lipídico pode ser uma deposição fisiológica normal, pode também ser um mecanismo para defesa contra contaminantes lipossolúveis (Sylvie et al., 1996).

Um aumento na densidade de agregados de melanomacrófagos, como observados no fígado de *A. aff. paranae*, geralmente está relacionado a lesões hepáticas importantes (Pacheco e Santos, 2002), tal como processos degenerativos e necróticos. Vários autores já sugeriram o envolvimento destes centros de melanomacrófagos em vários processos patológicos tal como inanição ou exposição a substâncias químicas (Couillard e Hodson, 1996; Long et al., 1995; Mela et al., 2013a e b) indicando que esses centros podem fornecer indicadores sensíveis a condições de estresse no ambiente aquático (Chang et al., 1998).

As necroses observadas no fígado de *A. aff. paranae* podem refletir falhas nos mecanismos de proteção celular na presença de estresse químico inespecíficos (Rabitto et al., 2005). Os hepatócitos estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e a morte de células devido à necrose pode levar a diferentes níveis de falhas hepáticas que podem afetar o organismo inteiro.

A necrose tem sido associada com estresse oxidativo onde a peroxidação lipídica é uma fonte clara de susceptibilidade da bicamada lipídica (Avci et al., 2005; Li et al., 2000). Poluentes têm sido relacionados como causadores do aumento da concentração de radicais livres dentro do citosol. Dos resultados obtidos para peroxidação lipídica (LPO) valores significativamente maiores foram observados no ponto a jusante, mostrando-se muito elevados especialmente no verão. A lipoperoxidação tem se mostrado um potencial biomarcador de contaminação ambiental de vários

tipos (Stegeman et al., 1992), e através dela podemos inferir sobre os danos causados às células pelo estresse oxidativo (Kappus, 1987), que podem levar a danos ao DNA e a nível histológico.

A catalase que é uma enzima intracelular localizada no peroxissomo, que facilita a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metabolizando-o em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (Van der Oost et al., 2003). O peróxido de hidrogênio é um exemplo de espécie reativa de oxigênio, que assim como os radicais livres, são formados durante o metabolismo oxidativo e de xenobiontes. Em geral um aumento na atividade da catalase indica a ativação do sistema de defesa antioxidante para manter a homeostase redox celular contra compostos pro-oxidantes e assim evitar o estresse oxidativo (Clemente et al., 2010), enquanto que uma redução na atividade desta enzima pode levar a este estresse. O estresse oxidativo pode provocar danos a biomoléculas importantes tal qual proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, e por fim culminar em consequências deletérias para a integridade, funcionamento e sobrevivência celular (Livingstone, 1993, 2001). A diminuição observada na atividade da catalase no ponto a jusante no verão pode ser causador da elevada peroxidação lipídica observada nesta estação e pode estar relacionado com algumas das alterações histopatológicas observadas no fígado de *A. aff. paranae*.

Assim como a catalase, a GST participa na degradação do peróxido de hidrogênio, tendo um papel importante na defesa do DNA e lipídios contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos (Van der Oost et al., 2003). Na comparação entre estações, a atividade da GST mostrou-se significativamente inibida no verão, o que pode ter provocado o estresse oxidativo corroborado pelas outras enzimas.

Também houve uma inibição significativa da GST nos indivíduos do Rio do Campo, principalmente no ponto a montante da cidade, fato este que pode ser atribuído à poluição por pesticidas. A redução significativa na atividade da GST já foi observada em peixes de ambientes poluídos (Van der Oost et al., 2003) e peixes expostos a dibenzodioxinas policloradas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Van der Oost et al., 2003) ou expostos ao herbicida mais usado na região, o glifosato (Lushchak et al., 2009) e inseticidas piretroides como a deltametrina (Pimpão et al., 2007), também utilizada na região.

Em relação a funções neurais, as enzimas de interesse são as colinesterases (ChE). A mensuração da atividade da ChE é muito utilizada para diagnosticar exposição a tóxicos anticolinesterásicos em peixes, e pode ser considerado um dos mais antigos biomarcadores (Silva de

Assis, 1998; Sturm et al., 2000). AChE está envolvida na desativação da acetilcolina na sinapse, prevenindo o estímulo contínuo do neurônio, o que é vital para o funcionamento normal do sistema sensorial e motor (Payne et al., 1996). Em *Astyanax aff. paranae*, houve no inverno um aumento significativo da AChE cerebral no ponto a montante da cidade, sem diferença entre o ponto a jusante e a Rebio. Por outro lado, no verão o maior valor foi encontrado na Rebio, com uma acentuada redução desta enzima nos pontos do Rio do Campo. Este mesmo resultado obtido no verão também foi encontrado para a AChE muscular.

Esta redução na AChE pode ser atribuída aos poluentes existentes na água do Rio do Campo, de origem agrícola, industrial e efluentes do tratamento do esgoto. Compostos como inseticidas organofosforados e carbamatos, além de metais pesados e detergentes já são conhecidos por sua ação inibidora da acetilcolinesterase (Sturm et al., 2000). Pesticidas como o metamidofós, que está em segundo lugar em vendas na cidade, apresentam efeito conhecido como inibidor da acetilcolinesterase (Sheets et al., 1997). Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Al-Ghais (2013) e de Payne et al. (1996) onde uma notável queda na AChE foi vista nos tecidos de peixes expostos a efluentes urbanos comparados com um local referência não poluído. Neste primeiro estudo, os autores mostraram ainda que o biomarcador AChE pode responder a baixos níveis de contaminantes no ambiente de ordem mais difusa e inespecífica.

2.5 CONCLUSÃO

O uso de vários biomarcadores em *A. aff. paranae* foi uma ferramenta efetiva e sensível para refletir condições ambientais adversas à saúde dos peixes. Com estes, observou-se que o trecho de rio a jusante de uma zona urbana, com descargas de efluentes da estação de tratamento de esgoto municipal e de despejos industriais mostrou-se mais alterado, seguido pelo local a montante da zona urbana, circundado por áreas de agricultura intensiva. A Reserva Biológica das Perobas mostrou-se como um local de referência pouco alterado. Sugere-se que estudos adicionais sejam realizados para corroborar a presença de xenobióticos ou outras substâncias tóxicas que podem potencialmente afetar as espécies dentro das áreas estudadas e as populações humanas que fazem uso destes corpos hídricos. Ressalta-se também uma forte necessidade do monitoramento dos efeitos da poluição ambiental sobre a vida selvagem em outras regiões do Brasil.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte logístico fornecido pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) da Reserva Biológica das Perobas, à prestatividade da Secretaria de Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB- Campo Mourão); ao grupo Nupélia (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura), o apoio financeiro da Fundação Araucária; a Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI); e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Proex), uma entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos.

REFERÊNCIAS

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Akaishi, F.M., Assis, H.C.S. De, Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Ribeiro, C.A.O., 2004. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp .) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 253, 244–253.
- Alberto, A., Camargo, A.F.M., Verani, J.R., Costa, O.F.T., Fernandes, M.N., 2005. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 247–55.
- Al-Ghais, S.M., 2013. Acetylcholinesterase, Glutathione and Hepatosomatic Index as Potential Biomarkers of Sewage Pollution and Depuration in Fish. *Mar. Pollut. Bull.* 74, 183–186.
- APHA -AWW - WEF, A.P.H.A.-A.W.W.A.-W.E.F., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., 1999. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 62–72.
- Avci, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 101–5.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25–34.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Brasil 2000. Sistema Nacional de Unidades de Conservação SNUC, Presidência da República do Brasil. Lei n°. 9985, de 18 de junho de 2000. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/sistema-nacional-de-ucs-snuc>, acesso em 17 nov 2013.

Brasil. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>, acesso em 17 nov 2013.

Brito, I. de A., Arruda Freire, C., Yamamoto, F.Y., Silva de Assis, H.C., Rodrigues Souza-Bastos, L., Cestari, M.M., de Castilhos Ghisi, N., Prodocimo, V., Filipak Neto, F., de Oliveira Ribeiro, C.A., 2012. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *J. Environ. Monit. JEM* 14, 615–25.

Bucher, F., Hofer, R., 1993. The effects of treated domestic sewage on three organs (Gills, Kidney, Liver) of Brown trout (*Salmo trutta*). *Water Res.* 27, 255–261.

Bussolaro, D., Neto, F.F., Gargioni, R., Fernandes, L.C., Randi, M.A.F., Pelletier, E., Ribeiro, C.A.O., 2008. The immune response of peritoneal macrophages due to exposure to inorganic lead in the house mouse *Mus musculus*. *Toxicol. Vit.* 22, 254–260.

Carrasco-Letelier, L., Eguren, G., de Mello, F.T., Groves, P.A., 2006. Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. *Chemosphere* 62, 1245–52.

Castella, P.R., Britez, R.M., 2004. A floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes florestais. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41–6.

Çavas, T., 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431–5.

Çavas, T., Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–8.

Chang, S., Zdanowicz, V.S., Murchelano, R.A., 1998. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries. *ICES J. Mar. Sci.* 55, 954–969.

Clemente, Z., Busato, R.H., Oliveira, C.A., Cestari, M.M., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Wosiack, A.C., Silva de Assis, H.C., 2010. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian Reservoir. *Toxicon* 55, 396–406.

Couillard, C.M., Hodson, P. V., 1996. Pigmented Macrophage Aggregates: A Toxic Response in Fish Exposed to Bleached-Kraft Mill Effluent? *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1844–1854.

Dyk, J.C. Van, Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere* 87, 301–311.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C., Freiburger, S., 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 119–130.

- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., 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. *Genet. Mol. Biol.* 27, 103–107.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J., 2002. Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 145–153.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.* 681, 80–92.
- Greenfield, B.K., Teh, S.J., Ross, J.R.M., Hunt, J., Zhang, G., Davis, J. a, Ichikawa, G., Crane, D., Hung, S.S.O., Deng, D., Teh, F.-C., Green, P.G., 2008. Contaminant concentrations and histopathological effects in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 270–81.
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., Silva, I.C.R., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.* 32, 138–143.
- Grisolia, C.K., Starling, F.L., 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491, 39–44.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25, 523–30.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-Transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398–405.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of Lipid Peroxidation in Tissue Extracts based on Fe(III)xilenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 271–280.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J. V, Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–9.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* 4, 260–267.
- Kappus, H., 1987. A Survey of Chemical Inducible Lipid Peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* 45, 105–115.
- Kohli, M.M., Rajaram, S., 1988. Wheat Breeding for Acid Soils: Reviewer of Brazilian/ CIMMYT Collaboration.
- Lemos, C.T. de, Iranço, F.D.A., Oliveira, N.C.D., Souza, G.D. de, Fachel, J.M.G., 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes : Characidae) at sites under petrochemical influence. *Sci. Total Environ.* 406, 3–9.
- Li, Q.T., Yeo, M.H., Tan, B.K., 2000. Lipid peroxidation in small and large phospholipid unilamellar vesicles induced by water-soluble free radical sources. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 72–6.

- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and Pollution Monitoring : Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57, 195–211.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lobo, E.A., Callegaro, V.L., Bender, E.P., 2002. Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil. EDUNISC, Santa Cruz do Sul.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D., 1995. Incidence of Adverse Biological Effects Within Ranges of Chemical Concentrations in Marine and Estuarine Sediments. *Environ. Manage.* 19, 81–97.
- Lushchak, O. V, Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932–7.
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Rabitto, I.S., Silva, C.A., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Randi, M.A.F., Ribeiro, C.A.O., Assis, H.C.S. De, 2013a. Ecotoxicology and Environmental Safety Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 108–116.
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M.A.F., Ribeiro, C.A.D.O., Pereira, L., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Assis, H.C.S. De, 2013b. Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of the herbicide atrazine in neotropical cat fish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21.
- Mizote, L.T.M., 2008. Agenda 21 Local de Campo Mourão: do projeto ao processo. Município de Campo Mourão, Campo Mourão/Pr, 238p.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology , antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Voltaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve , France. *Aquat. Toxicol.* 74, 53–69.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 331–347.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase , an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231.
- Pimpão, C.T., Zampronio, A.R., Silva De Assis, H.C., 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei) *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 122–127.
- Rabitto, I.S., Alves Costa, J.R.M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E.E., Akaishi, F.M., Anjos, A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 147–56.
- Rabitto, I.S., Rodrigues, W., Almeida, R., Anjos, A., Holanda, B.Í.B., Galvão, C.R.F., Filipak Neto, F., Menezes, M.L., Santos, C.A.M., Oliveira Ribeiro, C.A., 2011. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. *Environ. Int.* 37, 56–65.

- Rossi, S.C., Piancini, L.D.S., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2011. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 603–607.
- Sautchuk, C., Farina, H.; Hespanhol, I.; Oliveira, L.H., Costi, L.O., Ilha, M. S. O.; Gonçalves, O.M., May, S., Boni, S.S.N., Schmidt, W., 2005. Conservação e reuso da água em edificações. Prol Editora Gráfica, São Paulo.
- SEMA – Campo Mourão, Secretaria de Agricultura e Meio Ambiente, 2008. Agenda 21 Local de Campo Mourão. Município de Campo Mourão, 238p. Disponível em: <http://agenda21cm.org/noticias.php?id=1283>, acesso em 17 nov 2013.
- Setti, A.A., Lima, J.E.F.W., Chaves, A.G.M., Pereira, I.C.P., 2000. Introdução ao Gerenciamento de Recursos Hídricos, 2nd ed. Agência Nacional de Energia Elétrica, Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas, Brasília.
- Sheets, L.P., Hamilton, B.F., Sangha, G.K., Thyssen, J.H., 1997. Subchronic Neurotoxicity Screening Studies with Six Organophosphate Insecticides: An Assessment of Behavior and Morphology Relative to Cholinesterase Inhibition. *Fundam. Appl. Toxicol.* 35, 101–119.
- Silva, C.A., Ribeiro, C.A.O., Katsumiti, A., Araujo, M.L.P., Zandóna, E.M., Costa Silva, G.P., Maschio, J., Roche, H., Silva De Assis, H.C., 2009. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 400–409.
- Silva de Assis, H.C., 1998. Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. Technische Universität Berlin.
- Silva, J.R.R., Filho, H.O., 2011. Dípteros ectoparasitas (Insecta, Diptera) em morcegos (Chiroptera, Mammalia) na Reserva Biológica das Perobas Paraná, Brasil. *Iheringia, Série Zool.* 101, 220–224.
- StatSoft, I., 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. Disponível em : www.statsoft.com , acesso em 17 nov 2013.
- Stegeman, J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, in: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, USA, pp. 235–335.
- Stegeman, J.J., Miller, M.J., Woodin, B.R., Blair, J.D., 1993. Effect of B-Naphthoflavone on Multiple Cytochrome P450 Forms in Primary Cultures of Rainbow Trout Hepatocytes. *Mar. Environ. Res.* 35, 209.
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M., 2000. Different Sensitivity to Organophosphates of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase from Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in Biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1607–1615.
- Sylvie, B., Pairault, C., Vernet, G., Boulekbach, H., 1996. Effect of Lindane on the Ultrastructure of the Liver of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Sac-Fry. *Chemosphere* 33, 2065–2079.
- Towsend, C.R., Begon, M., Harper, J.L., 2006. *Fundamentos em Ecologia*, 2nd ed. Artmed, Porto Alegre.

Triebskorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H.-R., 2008. Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environ. Monit. Assess.* 141, 177–88.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2012. Conductivity What is conductivity and why is it important? Disponível em: <http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms59.cfm>, acesso em 16 nov 2013.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.

Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J., Sordyl, H., 2007. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutat. Res.* 628, 19–30.

Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere* 88, 377–83.

3 AVALIAÇÃO *IN SITU* DE UM RIO RECEPTOR DE EFLUENTES AGRÍCOLAS E URBANOS, ATRAVÉS DO USO DE MULTIBIOMARCADORES EM PEIXE NEOTROPICAL

Nédia de Castilhos Ghisi; Elton Celton de Oliveira; Luís Fernando Fávaro, Helena Cristina da Silva de Assis; Alberto José Prioli

N.C. Ghisi, A.J. Prioli. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) /Nupélia, Universidade Estadual de Maringá (UEM) Maringá, PR, Brasil.

E. C. Oliveira. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Dois Vizinhos, PR, Brasil.

H. C. Silva de Assis. Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR) Brasil.

L. F. Favaro. Laboratório de Reprodução e Comunidade de Peixes, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

Resumo

Este estudo buscou avaliar, através de um bioindicador, a qualidade de um corpo hídrico de médio porte, receptor de efluentes agrícolas e urbanos, inclusive da estação de tratamento de água e esgoto da cidade. O teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa sanguíneo e branquial, e histopatologia branquial foram avaliados no peixe *Astyanax aff. paranae*. Os peixes foram coletados em três pontos amostrais durante o verão e inverno de 2011 no noroeste do Paraná, Brasil: 1) local situado em uma reserva biológica; 2) ponto a montante da região urbana de Campo Mourão, cercado por áreas agrícolas; 3) jusante desta cidade, logo após a estação de tratamento de esgoto. Nossos resultados mostram as maiores alterações foram registradas nos peixes residentes no ponto a jusante, seguido pelos indivíduos do ponto a montante. Podemos inferir que os efluentes de esgoto estão afetando negativamente os indivíduos que habitam o ponto a jusante, e a poluição agrícola por ser mais difusa, afeta em menor proporção.

3.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e a intensa urbanização ao longo das margens dos rios têm introduzido grandes quantidades de substâncias na água, incluindo milhares de compostos químicos orgânicos e inorgânicos chamados xenobióticos (Van der Oost et al. 2003). O despejo desses poluentes de origem industrial, doméstica ou agrícola na água vem afetando negativamente a biodiversidade aquática, bem como a saúde da população humana que depende destes corpos hídricos para sobreviver e manter seu estilo de vida (Amorim 2003). Muitos destes poluentes lançados nos corpos d'água não são removidos pelos métodos tradicionais de depuração, como estações de tratamento da água e na autodepuração do manancial superficial e, portanto permanecem ativos no ambiente.

Muitas espécies de animais podem ser usadas como bioindicadores para testar os efeitos destas substâncias. Entre os mais usados, os peixes são modelos apropriados e relativamente sensíveis, amplamente usados com bioindicadores de impactos em ambientes aquáticos em vários níveis de resposta (Al-Sabti e Metcalfe 1995; Benincá et al. 2011; Brito et al. 2012).

47 Peixes do gênero *Astyanax* Baird e Girard (1854) estão entre os mais importantes
48 componentes das cadeias alimentares em rios da América do Sul, com uma participação
49 significativa na dieta de peixes maiores (Prioli et al. 2002). Contudo, os estoques de algumas
50 espécies deste gênero estão seriamente ameaçados pela introdução de predadores de grande
51 porte nos rios da região (Agostinho et al. 2007) e pela contaminação resultante de atividades
52 humanas. Esses peixes apresentam grandes vantagens como bioindicadores, pois são
53 abundantes no sul do Brasil, têm hábito onívoro, são de fácil captura, tamanho e resistência
54 adequados às condições laboratoriais (Alberto et al., 2005; Carrasco-Letelier et al., 2006),
55 sendo assim usado em muitas pesquisas recentes com este objetivo, tanto em bioensaios
56 como em estudos de campo (Alberto et al. 2005; Nogueira et al. 2009; Rossi et al. 2011).

57 Enquanto experimentos laboratoriais podem subestimar ou superestimar os efeitos
58 reais, estudos de campo comparando locais impactados e não impactados permitem uma
59 avaliação das condições gerais do animal no seu próprio ambiente, embora nem sempre seja
60 possível determinar com precisão o agente causal de todas as mudanças no organismo
61 (Alberto et al. 2005). Biomarcadores representativos e bem estabelecidos como o teste do
62 micronúcleo píceo e ensaio cometa, associado ao índice histopatológico de determinados
63 órgãos, podem fornecer uma boa estimativa da qualidade geral e de longo prazo daquele
64 ambiente. Um órgão muito útil é a brânquia, pois é o principal órgão para trocas gasosas na
65 maioria dos peixes e importante para regulação osmótica e iônica (Martinez e Souza 2002).

66 Assim, o objetivo foi avaliar a qualidade de um corpo hídrico submetido a diferentes
67 níveis de poluição, usando como bioindicador peixes *Astyanax aff. paranae* coletados em três
68 pontos amostrais durante o verão e inverno de 2011 .

69
70

71 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

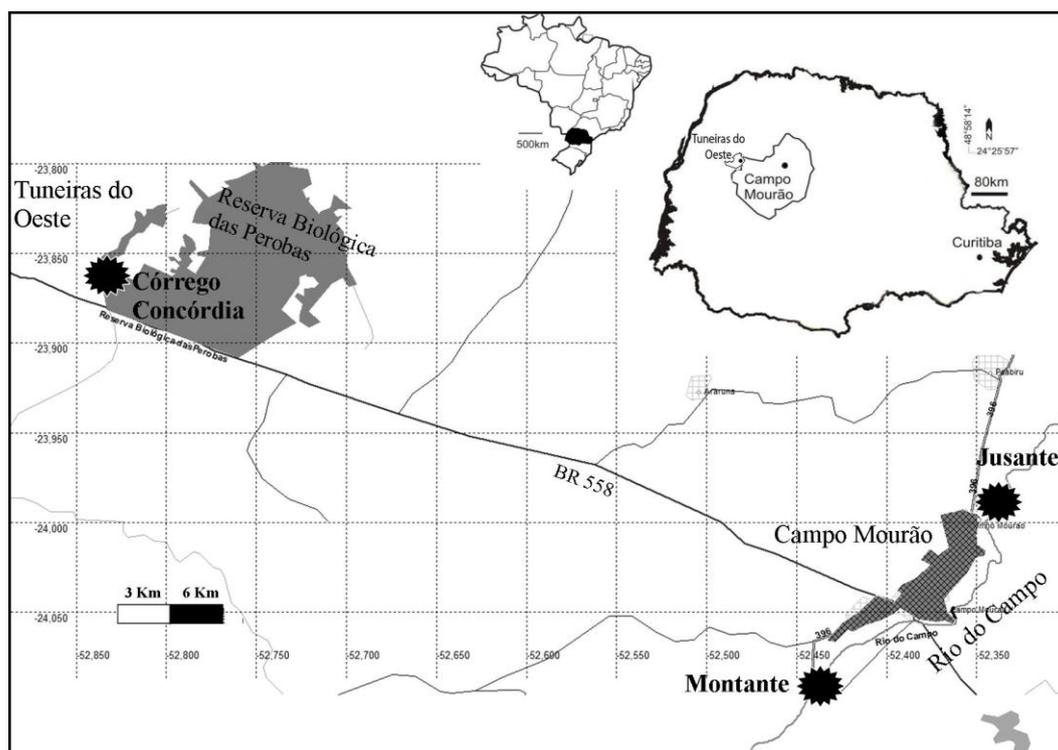
72 Foram determinados três pontos amostrais (Fig. 1): MP é um ponto localizado no rio
73 do Campo a montante da cidade de Campo Mourão, Paraná, na região sul do Brasil, cercado
74 apenas por áreas agrícolas, não atravessando áreas urbanas nem industriais. JP é o ponto a
75 jusante neste mesmo rio, caracterizado pela descarga de diferentes efluentes da cidade,
76 incluindo despejos industriais e da estação de tratamento de esgoto municipal. Os dois pontos
77 possuem uma barreira física: um represamento artificial para formação do lago no Parque
78 Municipal Joaquim Teodoro de Oliveira, que impede a migração dos indivíduos entre os
79 pontos. O terceiro ponto (RE) situou-se no córrego Concórdia da Reserva Biológica das
80 Perobas (Rebio) localiza-se em Tuneiras do Oeste, caracterizado por menor nível de
81 antropização e, desta forma, um controle negativo.

82 Campo Mourão é uma cidade de quase 90 mil habitantes e como muitas outras ao
83 redor do mundo, possui uma economia essencialmente agrícola. Destaca-se pela expressiva
84 produção de grãos, especialmente soja e milho, propiciada pelo relevo plano e solos
85 profundos, que favorecem o desenvolvimento da agricultura mecanizada na região. A
86 agricultura ocupa 83,58% da área do município. Essa condição favorável para o uso intensivo
87 do solo tem levado, ao descuido quanto à conservação do mesmo, sendo que práticas
88 inadequadas favorecendo a erosão ainda são comuns na região (Mizote 2008).

89 Idealizou-se a coleta de aproximadamente 20 indivíduos de *Astyanax aff. paranae*
90 em cada ponto amostral (Fig. 1), durante duas estações – inverno (julho/2011) e verão
91 (novembro/2011). No momento da coleta dos peixes, foram tomadas as medidas de oxigênio
92 dissolvido, temperatura, condutividade e pH, com o auxílio de uma sonda multiparâmetros
93 (marca: Hanna, modelo: HI 9828) e amostras de água foram coletadas e preservadas em gelo
94 para posterior análise de componentes específicos: Demanda Química de Oxigênio (DQO),

95 fósforo, nitrogênio, cobre, alumínio e zinco, realizadas no laboratório de química da UTFPR-
 96 Campo Mourão, seguindo-se as metodologias do Standard Methods (APHA -AWW - WEF
 97 2005).

98 Todos os procedimentos deste estudo foram conduzidos de acordo com o guia para
 99 uso e proteção de animais em laboratório (segundo o *Canadian Council on Animal Care*). As
 100 coletas foram autorizadas pelo órgão federal competente (Instituto Chico Mendes de
 101 Conservação da Biodiversidade – ICMBio licença nº 25129-1). Exemplares *vouchers* foram
 102 depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e
 103 Aquicultura (Nupelia) sob o nº de lote: montante e jusante NUP 13381 e Field:
 104 NCG2011103101; e Rebio: NUP13382 e Field NCG2011071701.
 105



106
 107 **Fig. 1** Área de coleta no centro-noroeste do estado do Paraná, Brasil, mostrando o ponto no
 108 rio do Campo, a montante da cidade de Campo Mourão e no mesmo rio a jusante da cidade; a
 109 esquerda o córrego Concórdia da REBIO das Perobas, município de Tuneiras do Oeste.

110
 111 Os animais capturados foram transportados ao laboratório e anestesiados com
 112 cloridrato de benzocaína 20%. Com auxílio de seringas de insulina heparinizadas foi
 113 realizada a coleta de sangue por punção cardíaca. Uma gota de sangue foi pingada em uma
 114 lâmina para realização do teste do micronúcleo píceo (MNP) de acordo com o protocolo de
 115 Heddle (1973) e Schmid (1975), sendo fixada com etanol PA e corada com Giemsa 10%. De
 116 cada indivíduo analisaram-se 1000 células, quantificando-se a presença de alterações
 117 morfológicas nucleares e micronúcleos.

118 O ensaio cometa foi feito com amostras de sangue e adaptado para brânquia, de
 119 acordo com Ferraro et al. (2004). Analisaram-se 100 nucleoides de cada peixe, usando a
 120 classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo as classes: 0 (sem
 121 dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo,
 122 apoptose). O escore foi calculado multiplicando o número de núcleos encontrados em dada
 123 classe pelo valor da classe.

124 Para microscopia de luz, as brânquias foram fixadas em Alfac por 12 h (etanol 80%
125 – 85 mL; formaldeído 40%–10 mL; ácido acético glacial –5 mL, para 100mL de solução).
126 Posteriormente, as brânquias foram desidratadas em séries graduais de banhos de etanol e
127 emblocadas em Paraplast Plus® (Sigma). Secções de 5 µm foram fixadas em lâmina, coradas
128 com Hematoxilina/Eosina e observadas em um fotomicroscópio. Foram quantificadas as
129 seguintes lesões: fusão total, hiperplasia, aneurisma, deslocamento de epitélio, necrose e
130 atrofia do epitélio. Usou-se o critério de Bernet et al. (1999) para classificar essas patologias
131 e obter um índice.

132 Todos os dados foram submetidos a testes de pressupostos de normalidade
133 (Kolmogorov–Smirnov) e homocedasticidade (teste de Levene). Como tais pressupostos
134 foram atendidos, usou-se ANOVA simples no caso de ausência de interação entre os fatores
135 ‘estação’ e ‘local de coleta’. No caso de interação entre os dois fatores, usou-se ANOVA
136 bifatorial. Diferenças entre grupos foram testadas pelo Teste de Tukey. O nível de
137 significância considerado foi 5%. Para todos os testes usou-se o programa Statistica, versão
138 8.0 (StatSoft 2007).

139
140

141 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

142 Não foram observadas variações consideráveis entre os dados abióticos, seja na
143 comparação entre estações seja entre diferentes locais (Tabela 1). Os maiores valores de
144 Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram encontrados a jusante, em ambas as estações.
145 A DQO representa o consumo de oxigênio ocorrido em função da oxidação química da
146 matéria orgânica e indica a quantidade de matéria orgânica biodegradável e não
147 biodegradável presente no efluente. Este é um importante parâmetro de controle da poluição,
148 sendo que uma DQO elevada pode indicar a presença de compostos tóxicos no efluente
149 (Valente et al. 1997).

150 A presença de materiais flutuantes, inclusive espumas não naturais foi evidente neste
151 ponto, em desacordo com a legislação brasileira, estabelecida na Resolução n° 357 (Brasil
152 2005). Os valores para o alumínio em todos os pontos superaram os valores máximos
153 permitidos por esta mesma resolução, mas provavelmente isto se deve ao excesso de alumínio
154 no solo da região (Kohli e Rajaram 1988).

155

156 **Tabela 1** Dados abióticos da água obtidos nos pontos de coleta. NTK= Nitrogênio Total
157 Kjeldahl. DQO= Demanda Química de Oxigênio, OD= Oxigênio dissolvido.

| Características físico- químicas da água (<i>in situ</i>) | Rebio | | Montante | | Jusante | |
|--|---------|-------|----------|-------|---------|-------|
| | inverno | verão | inverno | verão | inverno | verão |
| DQO (mg/L) | 7,491 | 5,948 | 7,063 | 7,807 | 8,922 | 9,665 |
| Oxigênio dissolvido (mg/L) | 8,34 | 5,95 | 7,16 | 6,36 | 7,99 | 5,78 |
| pH | 6,67 | 6,48 | 6,83 | 6,9 | 7,21 | 7,5 |
| Temperatura (°C) | 18,89 | 22,87 | 17 | 18,01 | 17 | 19,92 |
| Condutividade (µS/cm) | 25 | 18 | 40 | 20 | 86 | 42 |
| OD% | - | 73,4 | - | 6,7 | - | 68,1 |
| Alumínio (mg/L) | 0,77 | 0,945 | 0,89 | 1,04 | 0,74 | 0,868 |
| Cobre (µg/L) | 1,6 | 0,5 | 7,3 | 1,9 | 4,0 | 4,2 |
| Zinco (µg/L) | 1,7 | 3,45 | 3,7 | 5,2 | 3,7 | 4,8 |
| NTK (mg/L) | < 0,05 | 0,2 | < 0,05 | 0,05 | < 0,05 | 0,05 |
| Fósforo (mg/L) | 0,0124 | 0,945 | < 0,01 | 0,091 | 0,0183 | 0,054 |

158 Os métodos físicos e químicos permitem uma caracterização do ambiente, mas
159 fornecem apenas um conhecimento instantâneo, portanto limitado, das condições da água no
160 momento em que são feitas as medições. Essas limitações tornam-se um tanto mais drásticas
161 quando o sistema de estudo é um ambiente lótico, em que a correnteza faz com que a água
162 seja continuamente renovada em cada ponto. Esta é a situação observada nos locais
163 amostrados. Por outro lado, os biomarcadores utilizados para o monitoramento da qualidade
164 da água apresentam a vantagem de oferecer informações de efeito ambiental prolongado, isto
165 é, são capazes de refletir estados não mais existentes no momento da verificação, mas
166 originados a partir de processos ocorridos anteriormente no ecossistema (Lobo et al. 2002).

167 Com relação aos biomarcadores, observaram-se consistentes variações na forma
168 normal elíptica do núcleo nos eritrócitos dos peixes analisados. Para o teste de MNP
169 observamos interação estatística entre os fatores estação e local ($p < 0,001$). A maior
170 frequência de alterações foi encontrada nos peixes coletados na Rebio durante o verão (Fig.
171 2a), apesar de este ponto localizar-se em uma área de proteção ambiental designada Reserva
172 Biológica, que tem como objetivo a preservação integral da biota e demais atributos naturais
173 existentes em seus limites, sem interferência humana direta ou modificações ambientais
174 (Brasil 2000). Com relação à frequência de anormalidades nucleares nos outros pontos
175 amostrais e diferentes estações, que não aquele grupo amostral citado acima, pode se
176 observar uma tendência geral na formação de MNP, que corrobora com os dados do ensaio
177 cometa de sangue (Fig 2A-B), onde os menores índices de dano são notados na Rebio
178 (inverno), seguida pelo ponto a montante da cidade e a maior taxa de dano no ponto à jusante,
179 logo após o despejo da estação de tratamento de esgoto municipal. Essa tendência também é
180 evidenciada nos dados de histopatologia branquial (Fig. 2C) onde o menor índice de danos
181 foi encontrado na Rebio durante o inverno, e o maior no ponto a jusante da cidade durante o
182 verão; estes dois pontos diferiram significativamente entre si e das demais amostras. As
183 outras amostras formam um grupo com taxa intermediária de dano, sem diferenças entre si.

184 No ensaio cometa com brânquias, a menor taxa de dano foi encontrada na Rebio
185 durante o verão, sendo nesta estação significativamente diferente dos dois pontos no rio do
186 Campo – que não diferiram entre si. Já para o inverno, não houve diferença entre a Rebio e
187 ponto a montante; o ponto a jusante apresentou menor taxa de danos (Fig. 2D).

188 Vários estudos já apontaram os efeitos prejudiciais dos efluentes de estações de
189 tratamento de esgoto sobre peixes. O trabalho de Talapatra e Banerjee (2007) mostrou que
190 peixes que residem e se alimentam de esgoto desenvolvem altas taxas de anormalidades
191 nucleares, células necróticas e apoptóticas. Já o trabalho de Alberto et al. (2005) que também
192 estudou peixes do gênero *Astyanax*, qualificou-os como organismos com alta tolerância a
193 locais poluídos com efluentes de esgoto, pois tal estudo não observou diferença significativa
194 na morfologia branquial de *A. fasciatus* de um local que recebia efluentes de estação de
195 esgoto, em comparação a outro local não poluído. O estudo de Bucher e Hofer (1993)
196 também submeteu peixes a diluições em esgoto doméstico tratado, e observou alterações
197 histopatológicas em fígado e rim, mas não em brânquias. Narain et al. (1990) observou
198 alterações histológicas branquiais evidentes em peixes sujeitos a estresse pela poluição de
199 esgoto sendo a hiperplasia a alteração mais pronunciada. Os resultados deste último trabalho
200 concordam com os nossos resultados histopatológicos.

201 As principais alterações histológicas encontradas aqui, independente da estação de
202 coleta, foram principalmente fusão lamelar e hiperplasia – que comprometem as trocas
203 gasosas, seguidas de descolamento do epitélio, aneurisma e hipertrofia lamelar (Fig. 3). A
204 maioria dessas alterações histopatológicas podem ser interpretadas como resposta não
205 específica ao estresse e são descritas em peixes expostos a um amplo espectro de poluentes,
206 tal qual metais, hidrocarbonetos, contaminação orgânica, entre outros (Mallatt 1985). Pereira

207 et al. (2013) já demonstraram que a proliferação do epitélio lamelar e consequente fusão das
208 lamelas aumentam com o declínio da qualidade da água, mostrando altos níveis de severidade
209 em locais com estado ecológico deploráveis. Essas mudanças histológicas constituem
210 mecanismos de defesa para acentuar a distância de difusão entre a água e o sangue
211 (Schwaiger et al. 2004) e já foi estabelecido por outros autores como resposta a
212 contaminantes específicos (Arellano et al. 1999; Pane et al. 2004; Nero et al. 2006; Pereira et
213 al. 2013).

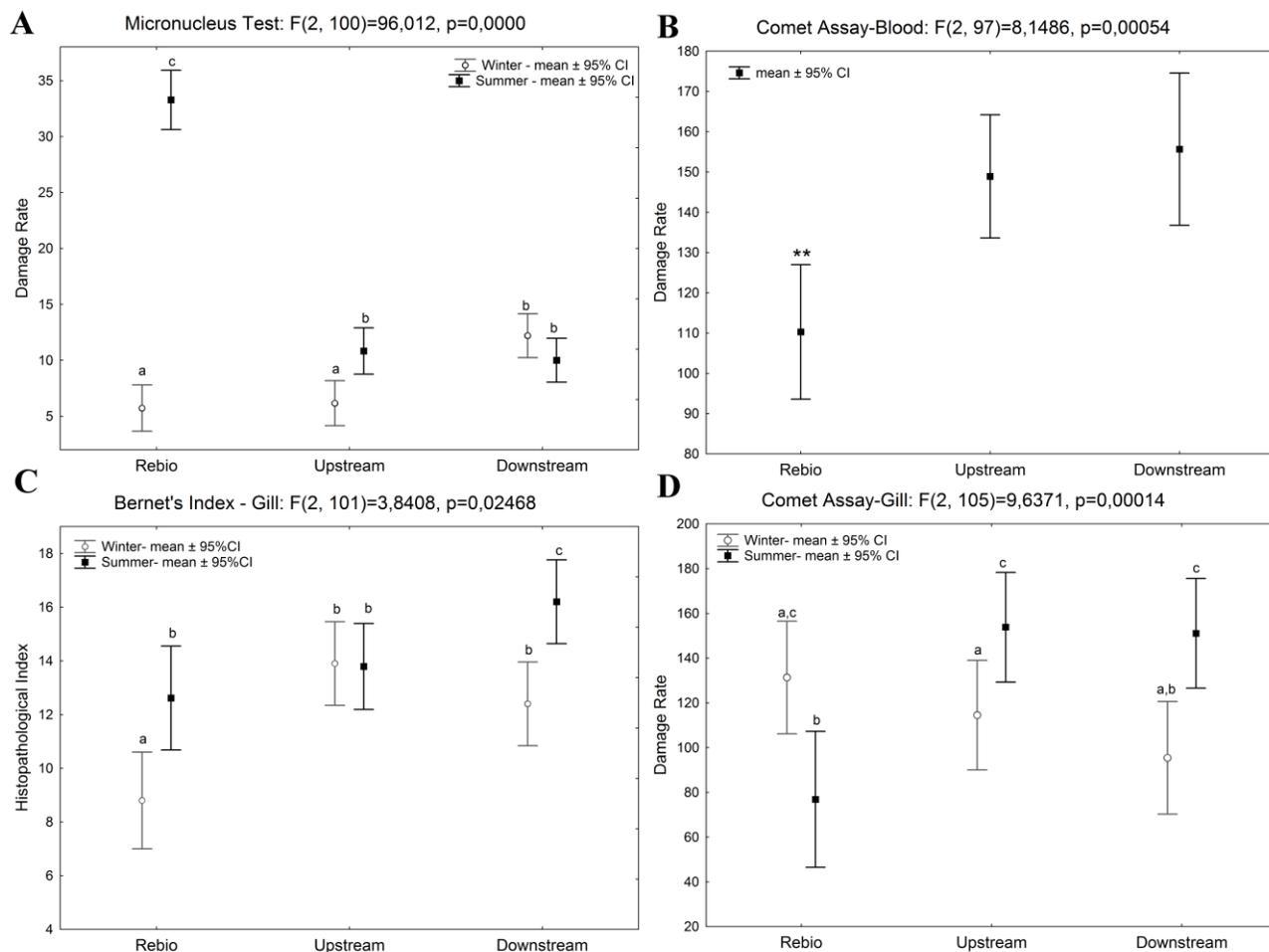
214 Foram encontradas outras alterações, mais esporádicas a constar: a) Rebio:
215 ocorrências de três locais de implantação de parasitas; um parasita; dois tumores benignos; b)
216 Montante: seis parasitas; dois locais de implantação de parasitas; um tumor benigno; necroses
217 e atrofia lamelares; c) Jusante: dois parasitas; dois locais de implantação parasítica; dois
218 tumores benignos; infiltração de leucócitos.

219 De uma maneira geral, o ponto a montante da cidade apresentou uma taxa
220 intermediária de danos histopatológicos. Sabe-se que este ponto, apesar de não sofrer
221 influência de poluição urbana, sofre influência de outras fontes poluidoras mais difusas,
222 considerando-se que se trata de um local rodeado por áreas agrícolas e que recebe efluentes
223 de pisciculturas localizadas nas suas cabeceiras (Guimarães 1999). Muitos trabalhos já
224 relataram os danos que pesticidas oriundos de atividades agrícolas podem causar ao material
225 genético ou aos tecidos de peixes (Rossi et al. 2011; Çavas 2011; Vera-Candioti et al. 2013),
226 e outros mais específicos tratam exclusivamente dos pesticidas aplicados em pisciculturas
227 (e.g. Maduenho e Martinez 2008). Portanto, podemos inferir que este local também está
228 sofrendo pressão devido a substâncias desta natureza que alcançam esse corpo hídrico.

229 Sobre os biomarcadores discutidos acima, a disparidade de resultados observada no teste do
230 micronúcleo písceo pode ser atribuída à baixa sensibilidade e variabilidade deste
231 biomarcador, como já observada por outros autores (Bücker et al. 2012; Wirzinger et al.
232 2007). Como teste genético, vários estudos já mostraram que o teste de MN é menos sensível
233 que o ensaio cometa (Ramsdor et al. 2012; Ramsdorf et al. 2008; Kim e Hyun (2006), pois
234 não detecta disjunção mitótica se esta não provocar perda cromossômica no anáfase, nem
235 aberrações cromossômicas, tal como translocação ou inversão se essas não originarem um
236 fragmento acêntrico (Metcalf 1989).

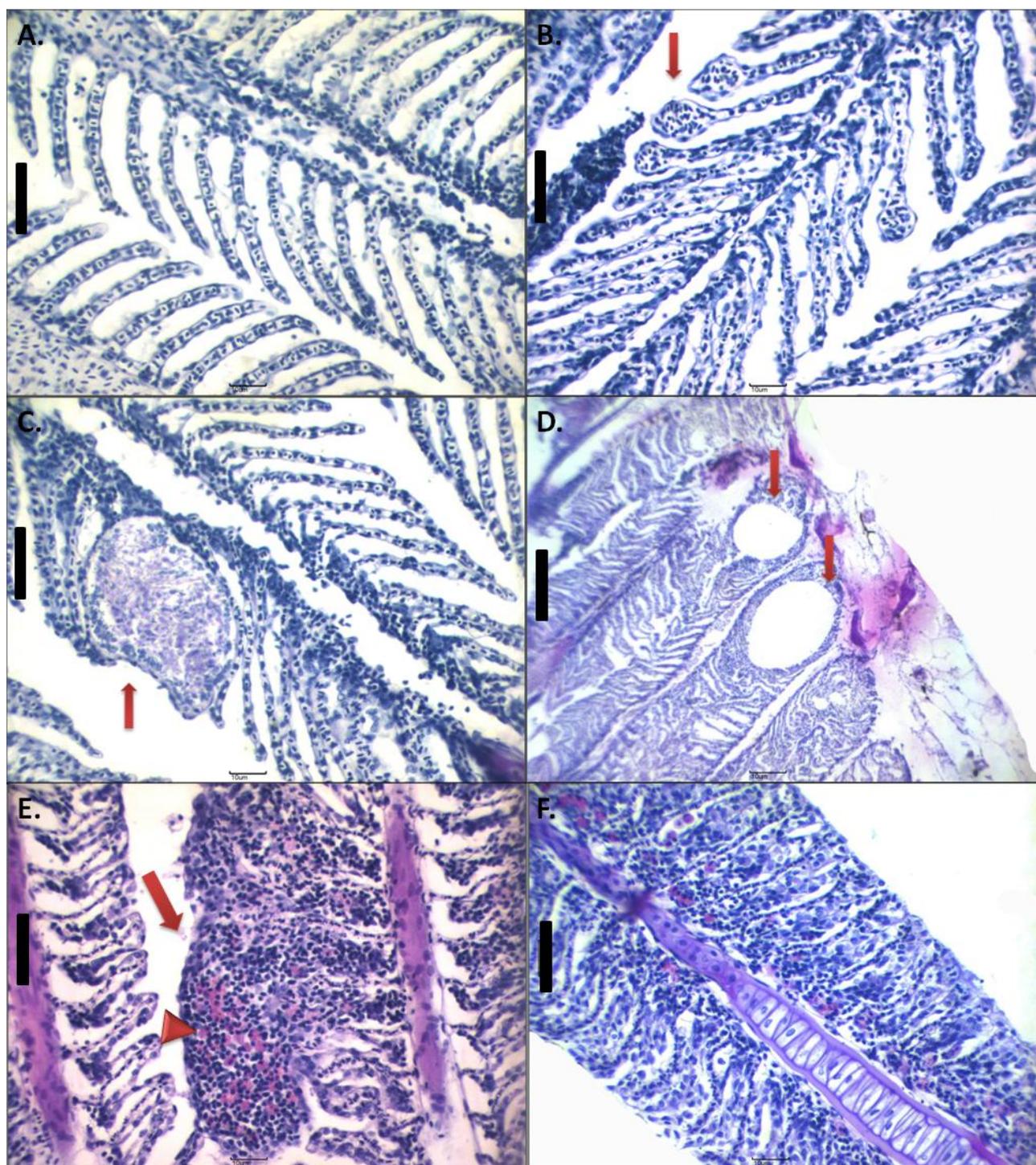
237 Por fim, de uma maneira geral nossos resultados demonstram um menor índice de
238 alterações na Rebio durante o inverno, seguida do ponto a montante e um maior índice de
239 dano à jusante da cidade de Campo Mourão. Este alto índice de alterações a jusante
240 provavelmente se deve a descarga de efluentes da estação de tratamento de esgoto que é
241 lançada no local e deve ser monitorada. Estudos adicionais com outros biomarcadores são
242 recomendados para corroborar os efeitos do esgoto e pesticidas sobre este e outros
243 organismos.

244
245



246
 247 **Fig. 2** Biomarcadores testados em *Astyanax* aff. *paranae* coletados na Reserva Biológica das
 248 Perobas (Rebio), a Montante (Upstream) e a Jusante (Downstream) da cidade de Campo
 249 Mourão (PR) durante o inverno (winter) e verão (summer) . F: Resultado da ANOVA. Letras
 250 diferentes (a, b, c,**) representam diferença significativa no teste de Tukey, $p<0,05$. C.I.:
 251 intervalo de confiança.

252
 253
 254
 255



256
257

258 **Fig. 3** Brânquias de *Astyanax aff. paranae*. **A** Lamelas normais; **B** (seta) aneurisma; **C**
259 parasita; **D** local de implantação parasítica; **E** tumor benigno, observar infiltração de
260 leucócitos (cabeça de seta); **F** fusão total das lamelas e hiperplasia. Nota: barra = 20μm.

261

262 **REFERÊNCIAS**

- 263 Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em
264 reservatórios do Brasil, 1ª ed. EDUEM, Maringá.
- 265 Alberto A, Camargo AFM, Verani JR, et al. (2005) Health variables and gill morphology in
266 the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicol Environ*
267 *Saf* 61:247–55. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.08.009
- 268 Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat*
269 *Res* 343:121–35.
- 270 Amorim LCA (2003) Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos
271 agentes químicos ambientais. *Rev Bras Epidemiol* 6:158–170.
- 272 APHA-AWW-WEF American Public Health Association - American Water Works
273 Association - Water Environment Federation (2005) Standard methods for the examination of
274 water and wastewater, 21ª ed. American Pubic Helth Association, Washington, DC
- 275 Arellano JM, Storch V, Sarasquete C (1999) Histological Changes and Copper Accumulation
276 in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:62–
277 72.
- 278 Benincá C, Ramsdorf W, Vicari T, et al. (2011) Chronic genetic damages in *Geophagus*
279 *brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast-Southern
280 of Brazil. *Environ Monit Assess*. doi: 10.1007/s10661-011-2098-3
- 281 Bernet D, Schmidt H, Meier W, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a
282 protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 22:25–34.
- 283 Bizzotto PM, Godinho AL, Vono V, et al. (2009) Influence of seasonal, diel, lunar, and other
284 environmental factors on upstream fish passage in the Igarapava Fish Ladder, Brazil. *Ecol*
285 *Freshw Fish* 18:461–472. doi: 10.1111/j.1600-0633.2009.00361.x
- 286 Brasil (2000) Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC). Lei nº. 9985 de 18 de
287 junho de 2000. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/sistema-nacional-](http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/sistema-nacional-de-ucs-snuc)
288 [de-ucs-snuc](http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/sistema-nacional-de-ucs-snuc) , acesso em 17 nov 2013.
- 289 Brasil. (2005) Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução nº 357, de 17
290 de março de 2005. 1–23. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/port/conama/res](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf)
291 [/res05/res35705.pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf), acesso em 17 nov 2013.
- 292 Brito I de A, Arruda Freire C, Yamamoto FY, et al. (2012) Monitoring water quality in
293 reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *J Environ*
294 *Monit JEM* 14:615–25. doi: 10.1039/c2em10461j
- 295 Bucher F, Hofer R (1993) The effects of treated domestic sewage on three organs (Gills,
296 Kidney, Liver) of Brown trout (*Salmo trutta*). *Water Res* 27:255–261.

- 297 Bückner A, Carvalho MS, Conceição MB, Alves-Gomes JA (2012) Micronucleus test and
298 comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to
299 benzene. J Brazilian Soc Ecotoxicol 7:65–73. doi: 10.5132/jbse.2012.01.010
- 300 Carrasco-Letelier L, Eguren G, de Mello FT, Groves PA (2006) Preliminary field study of
301 hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define
302 anthropogenic pollution. Chemosphere 62:1245–52. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.005
- 303 Çavas T (2011) In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on
304 fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. Food Chem Toxicol
305 49:1431–5. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.038
- 306 Ferraro MVM, Fenocchio AS, Mantovani MS, et al. (2004) Mutagenic effects of tributyltin
307 and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and
308 the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. Genet Mol Biol 27:103–107.
- 309 Guimarães RC (1999) Classificação interpretativa das terras em projetos de microbacias
310 hidrográficas: estudo de caso em uma sub-bacia hidrográfica no município de Campo
311 Mourão, Paraná.
- 312 Heddle JA (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat Res 18:187–90.
- 313 Instituto Chico Mendes para conservação da Biodiversidade (2012) Plano de Manejo da
314 Reserva Biológica das Perobas. 199.
- 315 Kim I-Y, Hyun C-K (2006) Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the
316 micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. Ecotoxicol Environ
317 Saf 64:288–97. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.05.019
- 318 Kohli, M.M., Rajaram, S., 1988. Wheat Breeding for Acid Soils: Reviewer of Brazilian/
319 CIMMYT Collaboration.
- 320 Lobo EA, Callegaro VL, Bender EP (2002) Utilização de algas diatomáceas epilíticas como
321 indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS,
322 Brasil. EDUNISC, Santa Cruz do Sul
- 323 Maduenho LP, Martinez CBR (2008) Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish
324 *Prochilodus lineatus*. Comp Biochem Physiol Part C 148:265–272. doi:
325 10.1016/j.cbpc.2008.06.010
- 326 Mallatt J (1985) Fish Gills Structural Changes induced by toxicants and other irritants: a
327 statistical review. Can J Fish Aquat Sci 42:630–648.
- 328 Martinez BR, Souza MM (2002) Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical
329 fish species. Comp Biochem Physiol Part A 133:151–160.
- 330 Metcalfe CD (1989) Testes for predicting carcinogenicity in fish. CRC Crit Rev Aquat Sci
331 1:111–129.

- 332 Mizote LTM (2008) Agenda 21 Local de Campo Mourão: do projeto ao processo. 238.
- 333 Narain AS, Srivastava AK, Singh BB (1990) Gill Lesions in the Perch, *Anabas testudineus*,
334 Subjected to Sewage Toxicity. Bull Environ Contam Toxicol 45:235–242.
- 335 Nel JL, Roux DJ, Maree G, et al. (2007) Rivers in peril inside and outside protected areas: a
336 systematic approach to conservation assessment of river ecosystems. Divers Distrib 13:341–
337 352. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00308.x
- 338 Nero V, Farwell A, Lister A, et al. (2006) Gill and liver histopathological changes in yellow
339 perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-
340 affected water. Ecotoxicol Environ Saf 63:365–77. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.04.014
- 341 Nogueira DJ, Castro SC, Sá OR (2009) Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae*
342 (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental
343 no reservatório UHE Furnas- Mg. Rev Bras Zootecias 11:227–232.
- 344 Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in
345 environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57–149.
- 346 Pane EF, Haque A, Wood CM (2004) Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory
347 toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon.
348 Aquat Toxicol 69:11–24. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.04.009
- 349 Pereira S, Pinto L, Cortes R, et al. (2013) Gill histopathological and oxidative stress
350 evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. Ecotoxicol Environ Saf
351 90:157–66. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.12.023
- 352 Prioli SMAP, Prioli AJ, Júlio Jr. HF, et al. (2002) Identification of *Astyanax altiparanae*
353 (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD
354 markers. Genet Mol Biol 430:421–430.
- 355 Ramsdorf WA, Ferraro MVM, de Oliveira Ribeiro CA, et al. (2008) Genotoxic evaluation of
356 different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. Environ Monit Assessment.
357 doi: 10.1007/s10661-008-0566-1
358
- 359 Ramsdorf WA, Vicari T, Almeida MIM, et al. (2012) Handling of *Astyanax* sp. for
360 biomonitoring in Canguiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation
361 Area) through the use of genetic biomarkers. Environ Monit Assess 184:5841–9. doi:
362 10.1007/s10661-012-2752-4
- 363 Rossi SC, Piancini LDS, Oliveira Ribeiro CA, et al. (2011) Sublethal Effects of Waterborne
364 Herbicides in Tropical Freshwater Fish. Bull Environ Contam Toxicol 87:603–607. doi:
365 10.1007/s00128-011-0397-6
- 366 Schmid W (1975) The micronucleus test. Mutat Res 31:9–15.

- 367 Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, et al. (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-
368 inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in
369 rainbow trout. *Aquat Toxicol* 68:141–50. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.014
- 370 StatSoft I (2007) STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. Disponível em:
371 www.statsoft.com, acesso em 17 nov 2013.
- 372 Talapatra SN, Banerjee SK (2007) Detection of micronucleus and abnormal nucleus in
373 erythrocytes from the gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. *Food*
374 *Chem Toxicol* 45:210–5. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.022
- 375 Valente JPS, Padilha PM, Silva AMM (1997) Oxigênio Dissolvido (OD), e Demanda
376 Bioquímica de Oxigênio (DQO) como Parâmetros de Poluição no Ribeirão Lavapés,
377 Botucatu (SP). *Eclet Quim* 22:49–66. doi: [http://dx.doi.org/10.1590/S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46701997000100005)
378 46701997000100005
- 379 Vera-Candioti J, Soloneski S, Larramendy ML (2013) Evaluation of the genotoxic and
380 cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish
381 *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1942). *Ecotoxicol Environ Saf* 89:166–173. doi:
382 10.1016/j.ecoenv.2012.11.028
- 383 Veregue AML, Orsi ML (2003) Biologia Reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae*
384 (Eigenmann) Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi,
385 Paraná. *Rev Bras Zool* 20:97–105.
- 386 Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, Sordyl H (2007) Genotoxic damage in field-collected
387 three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutat*
388 *Res* 628:19–30. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.11.011

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostraram que a poluição em áreas antropizadas está causando efeitos negativos nos organismos que as habitam. Primeiramente este estudo mostrou que efluentes urbanos e de uma estação de tratamento de esgoto podem causar alterações nos biomarcadores de organismos residentes, nos vários níveis de organização estudados: genético, bioquímico ou histológico. Usando-se dos mesmos biomarcadores, observamos também que o local situado próximo de uma região agrícola sofre com efeitos negativos, que podem ser atribuídos aos pesticidas utilizados nas lavouras do entorno e nas pisciculturas existentes a montante deste ponto. Levando isto em conta, recomenda-se a inclusão destes biomarcadores testados como ferramentas para Avaliação de Risco Ecológico em programas de monitoramento da poluição em corpos hídricos. Sabendo que corpos hídricos como estes são de grande utilidade para populações humanas residentes no local e em pontos a jusante, se tornam realmente preocupantes as possíveis consequências da contaminação deste rio para a saúde pública. Os resultados obtidos servem para alertar a sociedade e as autoridades sobre os perigos que as atividades antrópicas podem trazer para os ecossistemas e para a saúde pública, e podem ser úteis como fonte de informação para o estabelecimento e efetivação de leis para ações de recuperação do equilíbrio e de sustentabilidade do ecossistema local.

ANEXO A – Licença de Coleta de Fauna Silvestre:

Autorização para atividades com finalidade científica- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | |
|---|--|
| Número: 25129-1 | Data da Emissão: 27/04/2011 10:55 |
| Dados do titular | |
| Nome: Elton Celton de Oliveira | CPF: 039.062.859-01 |
| Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DA ÁGUA EM AFLUENTES DO RIO IVAÍ, A PARTIR DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA E DA UTILIZAÇÃO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES | |
| Nome da Instituição : Universidade Tecnológica Federal do Paraná | CNPJ: 75.101.873/0006-02 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|--|------------------|---------------|
| 1 | Possível data para primeira coleta de material | 05/2011 | 06/2011 |
| 2 | análise de dados e confecção de relatório da 1ª etapa | 06/2011 | 10/2011 |
| 3 | Possível data para segunda coleta de material | 10/2011 | 11/2011 |
| 4 | análise de dados e confecção de relatório da 2ª coleta | 11/2011 | 01/2012 |

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação. |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen . |
| 7 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |
| 8 | As atividades contempladas nesta autorização NAO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração. |

Outras ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As redes de pesca ("de emalhar") somente poderão ser utilizadas na Reserva Biológica das Perobas na forma de arrasto. |
|---|---|

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|--------------------------|---------------------|----------------|------------------|---------------|
| 1 | NÉDIA DE CASTILHOS GHISI | Responsável técnica | 049.814.579-44 | 88051343 SESP-PR | Brasileira |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|-------------------|----|-------------------------------|------------|
| 1 | TUNEIRAS DO OESTE | PR | RESERVA BIOLÓGICA DAS PEROBAS | UC Federal |

Atividades X Tâxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85952892



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | |
|------------------------|--|
| Número: 25129-1 | Data da Emissão: 27/04/2011 10:55 |
|------------------------|--|

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Elton Celton de Oliveira | CPF: 039.062.859-01 |
| Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL DA ÁGUA EM AFLUENTES DO RIO IVAÍ, A PARTIR DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA E DA UTILIZAÇÃO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES | |
| Nome da Instituição : Universidade Tecnológica Federal do Paraná | CNPJ: 75.101.873/0006-02 |

| # | Atividade | Taxons |
|---|---|--|
| 1 | Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ | Astyanax (*Qtde: 90), Astyanax fasciatus (*Qtde: 30), Astyanax altiparanae (*Qtde: 30) |

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

| | | |
|---|-----------------------------------|--|
| 1 | Método de captura/coleta (Peixes) | Amadilha (covo, manzuá, potes para polvos, substrato específico, manilha e variações), Peneira, Tarrafa, Rede de emalhar (emalhe de deriva, de fundo, malhadeiras, caceio, feiteiras, tresmalhos e caçoiera), Puçá |
|---|-----------------------------------|--|

Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino | Tipo Destino |
|---|--|----------------------|
| 1 | Universidade Tecnológica Federal do Paraná | criadouro científico |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85952892



