

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

CÁTIA CAPPELLI WACHTEL

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA A
AVALIAÇÃO DO PRINCIPAL RIO DE ABASTECIMENTO PÚBLICO
DA CIDADE DE DOIS VIZINHOS, PARANÁ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DOIS VIZINHOS

2017

Cátia Cappelli Wachtel

**UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA A
AVALIAÇÃO DO PRINCIPAL RIO DE ABASTECIMENTO PÚBLICO
DA CIDADE DE DOIS VIZINHOS, PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas - Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia

Coorientadora Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi

DOIS VIZINHOS

2017

W114u Wachtel, Cátia Cappelli.

Utilização de biomarcadores genéticos para a avaliação do principal rio de abastecimento público da cidade de Dois Vizinhos, Paraná. / Cátia Cappelli Wachtel – Dois Vizinhos: [s.n], 2017.
50f.:il.

Orientador: Dr. Thiago Cintra Maniglia.

Coorientadora: Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas. Dois Vizinhos, 2017.

Bibliografia p.39-44

1.Água – Qualidade - Medição. 2.Abastecimento de água. 3.Peixe - Pesquisa. 4.Rios - Paraná. I. Maniglia, Thiago Cintra, orient. II. Ghisi, Nédia de Castilhos, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV. Título



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 002

Utilização de biomarcadores genéticos para a avaliação do principal rio de abastecimento público da cidade de Dois Vizinhos, Paraná

Cátia Cappelli Wachtel

Dissertação apresentada às treze horas e trinta minutos do dia vinte e nove de maio de dois mil e dezessete, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Thiago Cintra Maniglia
UTFPR-Toledo

Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata
UTFPR-Curitiba

Thaís Souto Bignotto
UNIOESTE - Toledo

Prof. Dr. Eleandro José Brun
Coordenador do PPGSIS

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

AGRADECIMENTOS

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

Primeiramente a Deus, pois é a fonte que abastece a minha mente e o meu coração.

A minha família, que é meu porto seguro, principalmente a minha mãe Loreci que sempre se mostrou com amorosas palavras em momentos difíceis, além de incansáveis incentivos, ao meu pai Valmor que sempre esteve presente me apoiando, aos meus irmãos Evandro e Gabriel e minha querida nona Vilma, que sempre teve conselhos riquíssimos para me dar.

Quero expressar aqui minha imensa gratidão a minha Coorientadora Prof^a Dr^a. Nédia, por todo o apoio, confiança, ensinamento e tempo, pelas conversas com palavra de incentivo, sempre me entendendo, se mostrando uma grande amiga e conselheira além de orientadora, me ajudando em momentos difíceis, com palavras que continuamente me faziam pensar no próximo passo para não desanimar, o meu Muito Obrigada Nédia! Juntamente com o Professor Elton quero agradecer, pela força tarefa disponibilizada nas coletas e por suas contribuições.

Ao meu orientador Thiago por ter acreditado em mim, e pelo apoio sempre que precisei.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistema (PPGSIS) e a todos os professores que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

As professoras membros da banca: Wanessa e Thais, pelas contribuições.

Aos colegas de coleta em especial ao Denis e a Aliciane, que sempre estiveram presente colaborando para a realização desse trabalho.

E a todos aqueles que de alguma maneira me apoiaram me incentivaram e contribuíram diretamente ou indiretamente para a execução desse trabalho, OBRIGADA!

"Quanto mais eu estudo a natureza mais fico impressionado com a obra do Criador. Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias..."

"Proclamo Jesus como filho de Deus em nome da ciência. Meu espírito científico, que dá grande valor à relação entre causa e efeito, compromete-me a reconhecer que, se ele não o fosse, eu não mais saberia quem ele é. Mas ele é o filho de Deus. Suas palavras são divinas, sua vida é divina, e foi dito com razão que existem equações morais assim como existem equações matemáticas."

Louis Pasteur

RESUMO

Os corpos hídricos estão entre os ambientes mais prejudicados pelo crescimento desordenado da população humana. Considerando-se a grande importância de rios e lagos, tanto para os organismos residentes, quanto para a saúde da população humana, são necessárias estratégias que incluam, concomitantemente, a produtividade e a sustentabilidade em um mesmo ambiente, visando o equilíbrio ecológico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes tipos de poluição ao longo do Rio Jirau Alto, no município de Dois Vizinhos, PR, por meio de biomarcadores genéticos em peixes da espécie *Astyanax bifasciatus*, em duas estações do ano (verão e inverno). Foram empregados o teste de Alterações morfológicas nucleares (ENA) associado ao teste de micronúcleos e Ensaio Cometa em sangue e fígado como biomarcadores genéticos. As coletas foram realizadas em duas estações (verão e inverno de 2016) em quatro pontos amostrais ao longo do rio Jirau Alto, e um ponto controle em uma APP. Os biomarcadores empregados foram o ensaio cometa com eritrócitos e hepatócitos, e frequência de alterações morfológicas nucleares (ENA). O teste de micronúcleo pisco foi utilizado para determinar as quebras irreversíveis nos cromossomos de eritrócitos dos peixes e também alterações morfológicas nucleares de vários tipos. O ensaio cometa é uma técnica bastante eficiente nos estudos de agentes tóxicos que causam danos ao material genético, e por sua vez permite quantificar as quebras de DNA. Os resultados obtidos demonstraram evidências de contaminação nesse rio, os dados obtidos pelo teste de micronúcleo mostraram danos elevados, em todos os pontos amostrais quando comparados ao ponto controle, em ambas as estações. No teste de ensaio cometa, os valores de danos estiveram mais elevados, principalmente no verão e se mostrando com maior significância especialmente no ponto P2. No entanto, essa resposta foi não linear, evidenciando variações também entre os pontos e estações. Assim, pesquisas de monitoramento se tornam indispensáveis para a avaliação dos efeitos da poluição ambiental sendo necessária a conscientização da população, devido a ameaça de contaminação nesse rio, uma vez que desempenha papel importante no abastecimento público da cidade de Dois Vizinhos.

Palavras-chave: Contaminação aquática, biomonitoramento, ensaio cometa.

ABSTRACT

The water bodies are among the environments most affected by the disorderly growth of the human population. Considering the great importance of rivers and lakes, both for the resident organisms and for the health of the human population, strategies are needed that include, simultaneously, productivity and sustainability in the same environment, aiming at ecological balance. The objective of this work was to evaluate different types of pollution along the Jirau Alto River, in the municipality of Dois Vizinhos, PR, by means of genetic biomarkers in fish of the species *Astyanax bifasciatus*, in two seasons of the year (summer and winter). The Nuclear Morphological Changes (ENA) test associated with the micronucleus test and the Comet Assay in blood and liver were used as genetic biomarkers. The collections were carried out in two seasons (summer and winter of 2016) at four sampling points at the Jirau Alto river, and one control point at an APP. The biomarkers employed were the comet assay with erythrocytes and hepatocytes, and frequency of nuclear morphological changes (ENA). The micronucleus test was used to determine irreversible chromosome breaks in fish erythrocytes as well as nuclear morphological changes of various types. The comet assay is a very efficient technique in studies of toxic agents that cause damage to the genetic material, and in turn allows quantification of DNA breaks. The results obtained showed evidence of contamination in this river, the data obtained by the micronucleus test showed high damages, in all the sampling points when compared to the control point, in both stations. In the comet test, damage values were higher, especially in the summer and showing more significance especially at point P2. However, this response was non-linear, evidencing variations also between points and seasons. Thus, monitoring research becomes indispensable for the evaluation of the effects of environmental pollution and it is necessary to raise awareness of the population due to the threat of contamination in this river, since it plays an important role in the public supply of the city of Dois Vizinhos.

Keywords: Water contamination, biomonitoring, comet assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema demonstrando a formação de micronúcleo, sendo uma célula hipotética com apenas dois pares de cromossomos. a) Origem de um cromossomo inteiro e outro com fragmento de cromossomos, durante a anáfase e na formação do micronúcleo na telófase. b) Formação do micronúcleo quando, na anáfase os cromossomos são puxados para os polos da célula, sendo que pode ocorrer através de um agente genotóxico a quebra do cromossomo e a formação do mesmo na telófase. 18
- Figura 2 - Área de coleta na cidade de Dois Vizinhos, sudoeste do Estado do Paraná, Brasil, mostrando os pontos de coleta no Rio Jirau Alto (P1, P2, P3, P4 e PC). Nota: PC é o ponto controle. UTFPR-DV: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos. Seta: ponto de captação de água para tratamento e abastecimento público. 23
- Figura 3 - Diferentes Pontos de coleta do Rio Jirau Alto (P1, P2, P3 e P4), da cidade de Dois Vizinhos..... 23
- Figura 4 - Foto do Ponto Controle. UTFPR-DV: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos 23
- Figura 5 - Exemplar da espécie *Astyanax bifasciatus* coletado no rio Jirau Alto, Dois Vizinhos/ PR. Escala: barra= 2 cm..... 24
- Figura 6 – Frequência de Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares (ENAs) em *Astyanax bifasciatus*, coletados no Rio Jirau Alto nos diferentes pontos amostrais (P1, P2, P3 e P4) da cidade de Dois Vizinhos durante o inverno (winter) e o verão (summer) e Ponto Controle (control). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes sobre as barras (a, b) representam diferença significativa no teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). 27
- Figura 7 - Classes de danos encontrado no DNA de *Astyanax bifasciatus*, coletados no rio Jirau Alto. 28
- Figura 8 - Ensaio cometa de sangue em *Astyanax bifasciatus*, coletados no Rio Jirau Alto nos diferentes pontos amostrais (P1, P2, P3 e P4,) da cidade de Dois Vizinhos durante o inverno

(winter) e o verão (summer) e Ponto Controle (control). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b, c, d, e, f) representam diferença significativa $p < 0,05$ 29

Figura 9 – Frequência do Ensaio cometa do fígado em *Astyanax bifasciatus*, coletados no Rio Jirau Alto nos diferentes pontos amostrais (P1, P2, P3 e P4,) da cidade de Dois Vizinhos durante o inverno (Winter) e o verão (Summer) e Ponto Controle (Control). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b, c) representam diferença significativa $p < 0,05$ 30

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Média e desvio padrão ($X \pm SD$) encontradas através do teste de micronúcleos e outras anormalidades nucleares nos diferentes pontos amostrais e estações.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APP- Área de preservação permanente

Cfa- Clima subtropical

°C – graus Celsius

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENA- Alterações morfológicas nucleares

ICMS-Ecológico - ICMS Ecol. - Imposto sobre Operações Relativas à Circulação de Mercadorias e sobre Prestações de Serviços de Transporte Interestadual e Intermunicipal e de Comunicação (ICMS) Ecológico: Sub-critério Saneamento Ambiental – lixo (Leis Estaduais 12.040/1995 e 13.803/2000)

KW-H- Kruskal Wallis

MNP – Micronúcleo Písceo

mA- Miliampere

NaOH- Hidróxido de sódio

PC- Ponto controle

REBIO – Reserva Biológica

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

V- Volts

M – Molar

SIAGRO - Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná

SD- Desvio Padrão

X- Média

mg – Miligrama

mg/L⁻¹- Miligrama por litro

min – Minuto

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

pH – Potencial hidrogeniônico

UC – Unidade de conservação

µL- Microlitros

ZP – Zona de Proteção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL	16
2.2. TESTE DE MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	17
2.3 ENSAIO COMETA.....	18
2.4 ESPÉCIE ESTUDADA.....	19
2.5 ÁREA DE ESTUDO	20
1. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	22
3.2 PROCEDIMENTO AMOSTRAL.....	24
3.3 TESTE DE MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (ENA).....	25
3.3 ENSAIO COMETA.....	25
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS BIOMARCADORES.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1 MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES	27
4.2 ENSAIO COMETA SANGUE E FÍGADO	28
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	45
ANEXO 1- AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES.....	45
ANEXO 2: PARECER DE APROVAÇÃO NO CEUA – UTFPR.....	48

1. INTRODUÇÃO

O biomonitoramento de ecossistemas aquáticos é uma ferramenta importante para avaliação de impactos ocasionados nesse ambiente, pois detecta agentes estressores que causam ação prejudicial sobre populações ou comunidades de animais residentes. Assim, pode-se caracterizar diferentes concentrações de poluentes, que podem ser vistas em tempo e espaço diversificado, qualificando as condições flutuantes dos corpos hídricos para a permanência de organismos (JAGER et al., 2014).

Os rios e lagos são receptores de uma gama de substâncias químicas que podem causar alterações no seu estado natural, deixando-o impróprio para uso dos indivíduos que necessitam dele para sobreviver (PICADO et al., 2009) e ainda trazendo consequências irreversíveis à saúde dos animais residentes, podendo também atingir a população humana (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Existem vários fatores que contribuem progressivamente para o desequilíbrio biológico de um ambiente, favorecendo a percolação de xenobióticos para o interior dos corpos hídricos, originários de diferentes meios, podendo ser agrícola, industrial ou urbana (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015). Frente a essas informações, é necessário ressaltar a importância da pesquisa de campo, relacionada com biomarcadores genéticos, que detectam os efeitos dos poluentes sobre os organismos, destacando o uso principalmente de espécies de peixes como bioindicadores.

Alguns testes apontam danos genéticos, ocorridos na presença de xenobióticos, podem ser utilizados, tais como, micronúcleo e ensaio cometa (GUTIÉRREZ; VILLAR; PLAVAN, 2014; SILVA de ASSIS et al., 2013).

Pesquisas de campo possuem a vantagem de avaliar a saúde dos peixes em seu próprio ambiente, embora nem sempre seja possível determinar precisamente o agente causador dos danos. Apesar disto, alguns parâmetros avaliados nos animais podem fornecer uma boa estimativa da qualidade geral do ambiente (MARTINEZ; SOUZA, 2002)

Os peixes são membros comuns e de fácil amostragem, e se revelam como bioindicadores eficientes para avaliação de ambientes aquáticos impactados (FREITAS, E; SIQUEIRA-SOUZA, 2009; RABITTO et al., 2011). A espécie *Astyanax bifasciatus* é bastante conhecida na região sul do país, principalmente no estado do Paraná sendo amplamente distribuída no Rio Iguaçu.

Biomarcadores são definidos como respostas na avaliação de toxicidade medidos em fluídos corporais, avaliando diferentes tipos de modificações em tecidos ou células, encontradas devido a presença de substâncias tóxicas no meio, que detectam os efeitos ocasionados sobre os organismos, assim, demonstra a tolerância adquirida ou controlada por expressão gênica hereditária. (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Um dos benefícios de se empregar biomarcadores em peixes, é devido a importância dessa espécie na cadeia trófica (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011), pois a avaliação dos mesmos pode retratar a qualidade do ambiente aquático a longo prazo (RAMSDORF et al., 2012), e com isso é possível prevenir a incidência de agentes genotóxicos em níveis mais elevados, antes que dizimem toda uma população ou comunidade.

Dessa maneira, estudos de investigação ambiental são indispensáveis, uma vez que refletem na qualidade e sustentabilidade desses ambientes, sendo relevante para a gestão das bacias hidrográficas e na tomada de decisões dos órgãos ambientais (RAMSDORF et al., 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL

Atualmente a sustentabilidade tem sido um assunto amplamente discutido, pois, dentro de um agroecossistema deve existir o equilíbrio ecológico. A produção deve estar associada ao controle de recursos ambientais, de maneira que esses ambientes possam ter produção economicamente lucrativa, sem causar grandes prejuízos aos seus sistemas naturais (JONSSON; CASTRO, 2005).

Os corpos hídricos tem sido um dos ecossistemas mais prejudicados pela produção em larga escala. Em virtude da sua vital importância, esses locais vêm ganhando atenção especial entre os pesquisadores, pois as alterações nos corpos hídricos refletem diretamente na saúde humana (BERTI et al., 2009) e, lamentavelmente, são receptores de todo tipo de poluição, geralmente proveniente da agricultura, da indústria ou ainda pelo esgoto urbano. O fator mais preocupante é que muitas das substâncias tóxicas que são despejadas nos corpos hídricos possuem efeitos mutagênicos ou genotóxicos, e podem afetar indivíduos pertencentes a vários níveis tróficos dentro de uma organização ambiental.

Nesse contexto a deterioração dos ambientes aquáticos tem implicado diretamente na perda da biodiversidade aquática que, muitas vezes, traz consequências irreversíveis a esses ambientes. A preocupação com esses ambientes naturais vem aumentando, visando o melhor entendimento sobre a ação tóxica de algumas substâncias que são depositadas no meio aquático, observando a sua atuação sobre os organismos residentes e nas populações que fazem uso desta água (BERTI et al., 2009).

Nesse aspecto, os agroecossistemas tem grande relevância, porque favorecem o desenvolvimento econômico e ainda instituem estratégias para que a biota aquática não sofra grandes impactos, tendo como resultado a produção sustentável.

O biomonitoramento é importante, pois proporciona a avaliação de ambientes impactados, sendo também utilizados no controle de poluentes, visando mensurar os danos ocasionados pelas ações antrópicas em bacias hidrográficas ao longo do tempo.

Com isso o biomonitoramento se torna importante, pois observa através do uso de organismos bioindicadores a avaliação de estresses ocorridos no ambiente aquático, visando a realização de uma intensa análise da qualidade da água (TRUJILLO-JIMÉNEZ et al., 2011).

Dessa maneira bioindicadores são utilizados para análise de ambientes contaminados sendo provenientes de diversas fontes de poluição tais como esgotos domésticos e efluentes industriais (DUARTE, 2011). Assim bioindicadores são definidos como respostas individuais, que podem demonstrar alterações na sua estrutura genética, no qual apresenta modificações na composição e diversidade das espécies (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003)

Biomarcadores se referem a alterações de parâmetros biológicos individuais ou populacionais, avaliando organismos expostos a determinadas substâncias nocivas em condições ambientais ou laboratoriais. Entre os diferentes biomarcadores, os biomarcadores genéticos, são os mais utilizados em ambientes com ocorrência de poluição (POLARD et al., 2011).

2.2. TESTE DE MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

O teste de micronúcleo foi desenvolvido por Schmid (1975) e busca analisar substâncias químicas que tenham capacidade de realizar a quebra do DNA ou a formação incorreta da lâmina nuclear. Atualmente, o teste do micronúcleo písceo é realizado pela observação de células sanguíneas de peixes, sendo considerado um teste eficaz e bastante simples (GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016).

Micronúcleos são pequenas estruturas cromossômicas com formas arredondadas e escura (Fig.1) que possuem a mesma refração do núcleo principal, formadas quando determinada quantidade de material genético fica atrasada durante a divisão celular (BOMBAIL et al., 2001). Sabe-se que a formação do micronúcleo se dá na telófase, pois é nessa fase que se forma o envelope nuclear em torno dos cromossomos e/ou em fragmentos com atrasos (FENECH, 2000).

No teste de micronúcleo também é possível averiguar alterações morfológicas nucleares, formadas a partir do núcleo principal quando o mesmo apresenta algum tipo de distorção na lâmina nuclear (BOMBAIL et al., 2001). O trabalho realizado por Carrasco; Tilbury; Myers, (1990) apresenta a classificação para as deformações encontradas nos núcleos de eritrócitos de peixes, sendo denominadas como itens Bolha: Núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, que não estão totalmente separados do núcleo principal. Lobado: Núcleos com evaginações mais largas do que bolha, que podem apresentar mais que uma estrutura lobado. Vacuolado: Núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Binucleado: Células que apresentam dois núcleos. Entalhado:

Núcleos que apresentam um corte bem marcante em sua forma (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

A formação do micronúcleo em peixes e alterações nucleares se dá pela presença de agentes clastogênicos que agem diretamente no DNA ou na lâmina nuclear das células. Esses agentes podem ser encontrados no meio aquático, decorrentes de várias vias de poluentes, sendo sintéticos ou orgânicos, mas com o poder de causar erros genéticos em cromossomos (MARTINS; PAZ; BRENTANO, 2010). O teste de Micronúcleo Píscico é um teste apropriado para averiguar danos citogenéticos induzidos por agentes químicos ou físicos (MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014).

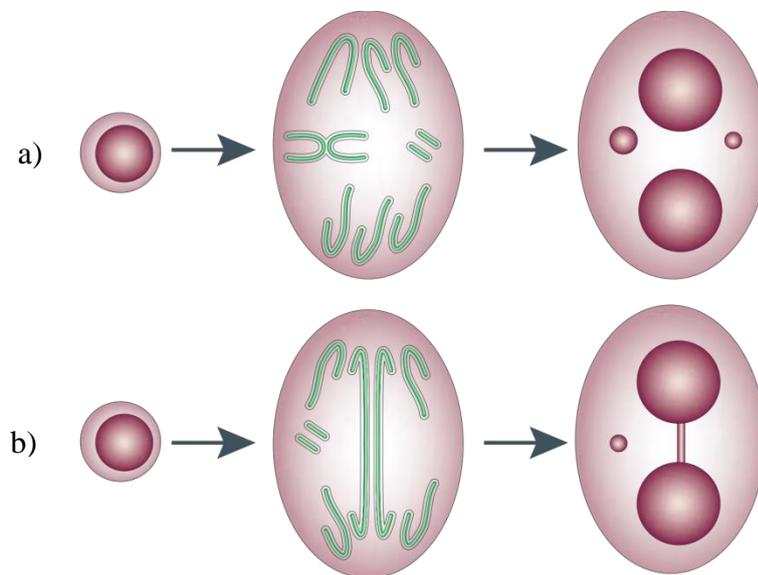


Figura 1 - Esquema demonstrando a formação de micronúcleo, sendo uma célula hipotética com apenas dois pares de cromossomos. a) Origem de um cromossomo inteiro e outro com fragmento de cromossomos, durante a anáfase e na formação do micronúcleo na telófase. b) Formação do micronúcleo quando, na anáfase os cromossomos são puxados para os polos da célula, sendo que pode ocorrer através de um agente genotóxico a quebra do cromossomo e a formação do mesmo na telófase.

Fonte: (FENECH, 2007).

2.3 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa ou eletroforese em gel de célula única é outro teste bastante utilizado em peixes para análise de agentes tóxicos, que causam dano ao material genético, sendo que esse permite quantificar a quebra de DNA, através da observação do tamanho da cauda do cometa.

O ensaio cometa investiga danos ao DNA através da migração do material genético em gel (SINGH et al., 1988). As células são inseridas em um gel que é submetido a uma corrente

elétrica, chamada de eletroforese. Esta, por sua vez, promove através do fluxo de elétrons, a migração dos fragmentos do DNA. As amostras são analisadas através de categorias já estabelecidas, quantificando o dano sobre o material genético (LEITE; ZANDONATO; FLUMINHAM, 2013). O nome cometa se refere à formação de uma cauda que é constituída por fragmentos de DNA que quanto menores, mais rápido migram (BOMBAIL et al., 2001).

De forma geral, o princípio do ensaio cometa é estabelecido através da quantificação de quebra do DNA, ou seja, se ele não possuir quebra em sua molécula, o mesmo migrará sobre o gel e formará um círculo apenas. Quando existirem quebras na fita de DNA, os fragmentos menores vão correr mais rápido e os maiores vão correr menos durante a eletroforese, formando assim uma cauda semelhante com um cometa (AVCI; KAÇMAZ; DURAK, 2005).

2.4 ESPÉCIE ESTUDADA

Para considerar um organismo como um bom bioindicador, é necessário observar sua importância ecológica, a sua sensibilidade junto aos efeitos tóxicos e sua abundância (JONSSON; CASTRO, 2005). O uso de peixes como bioindicadores constitui-se uma importante ferramenta para o monitoramento dos ambientes aquáticos, devido sua pluralidade além de fácil amostragem e eficientes para detectar ambientes impactados (FREITAS; SIQUEIRA-SOUZA, 2009).

Os animais que pertencem ao gênero *Astyanax* (Teleostei, Characidae) possui elevada riqueza na região neotropical (DA SILVA et al., 2010) portanto, amplamente distribuída pelo Brasil, são animais relativamente pequenos mais de grande relevância, pois são utilizado para o consumo humano (RAMSDORF et al., 2012). No entanto, apresentam valor comercial médio devido ao seu tamanho, mas são espécies forrageiras isso a torna de grande importância ecológica (GODOY, 1975).

A espécie *Astyanax bifasciatus* possui distribuição geográfica aparentemente restrita ao rio Iguaçu (BAUMGARTNER et al., 2012). Está espécie é uma das mais abundantes em lagoas e também na bacia do baixo Iguaçu. Isso deve-se principalmente a sua potencialidade reprodutiva e alimentar, por ser herbívoro e ainda apresentar oportunismo trófico (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015; BAUMGARTNER et al., 2012).

É caracterizado pelo seu corpo claro, nadadeira anal, caudal e dorsal avermelhada. Sua dieta é baseada em plantas e insetos pequenos (BAUMGARTNER et al., 2012), popularmente conhecida como lambari do rabo vermelho.

2.5 ÁREA DE ESTUDO

O Rio Jirau Alto está situado no município de Dois Vizinhos, o qual é localizado na região Sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. Possui uma área de 418 Km², com altitude média de 509 metros, encontrada entre as coordenadas geográficas 25°44'35''S e 53°4'30''W (PIGOSSO et al., 2009).

O município se destaca economicamente no setor agropecuário, especialmente avicultura, sendo um dos maiores responsáveis pela produção de aves no Estado do Paraná, considerado um dos melhores no ramo agroindustrial alimentício da América Latina, conhecido como Capital Nacional do Frango (BEAL, 2014).

O clima é subtropical e, de acordo com a classificação de Köppen, é denominado Cfa, com verão quente, sem estação de seca, e o clima é úmido, com chuvas distribuídas mensalmente e a temperatura mais quente no verão fica acima dos 22°C (ALVARES et al., 2013), com volume pluviométrico normalmente entre 2000 a 2500 mm anuais.

O rio Jirau Alto, Este rio é afluente do rio Dois Vizinhos, sub-bacia do rio Chopim, inserida na Bacia do Rio Iguaçu (PIGOSSO et al., 2009).

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo foi examina diferentes tipos de poluição, em locais distintos do Rio Jirau Alto, do Município de Dois Vizinhos, utilizando parâmetros genotóxicos e de mutagenicidade (o ensaio cometa e o teste de micronúcleo písceo) usando peixes da espécie *Astyanax bifasciatus* como bioindicadores em duas estações do ano no verão e inverno.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar as frequências de Micronúcleo e de Alterações Morfológicas Nucleares em hemácias de peixes;
- Quantificar os danos no DNA através do ensaio cometa em células do tecido hepático e em células sanguíneas.
- Comparar os dados obtidos nos diferentes biomarcadores para os diferentes pontos de coleta e entre diferentes períodos de seca e de chuva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Foram avaliados quatro pontos amostrais do rio Jirau Alto, no município de Dois Vizinhos. Este rio é afluente do rio Dois Vizinhos, sub-bacia do rio Chopim, inserida na Bacia do Rio Iguaçu (PIGOSSO et al., 2009). Os pontos foram constituídos das seguintes localidades (Fig.2): o primeiro ponto (P1) está situado próximo a nascente do rio; o segundo ponto (P2) está situado próximo à captação de água do município e após uma indústria frigorífica; o terceiro ponto (P3) fica em um trecho urbano do referido município, situado dentro do Parque Ecológico Municipal Jirau Alto; e o quarto ponto (P4) está na jusante próximo a foz onde o rio Jirau Alto desagua no rio Dois Vizinhos. O Ponto controle (PC) está situado dentro da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, da cidade de Dois Vizinhos (UTFPR-DV), lago situado em um local preservado, o qual serve de ambiente para pesquisas com diversas espécies de peixes e possui área total de 2,373 m² (GOOGLE EARTH MAPS, 2017).

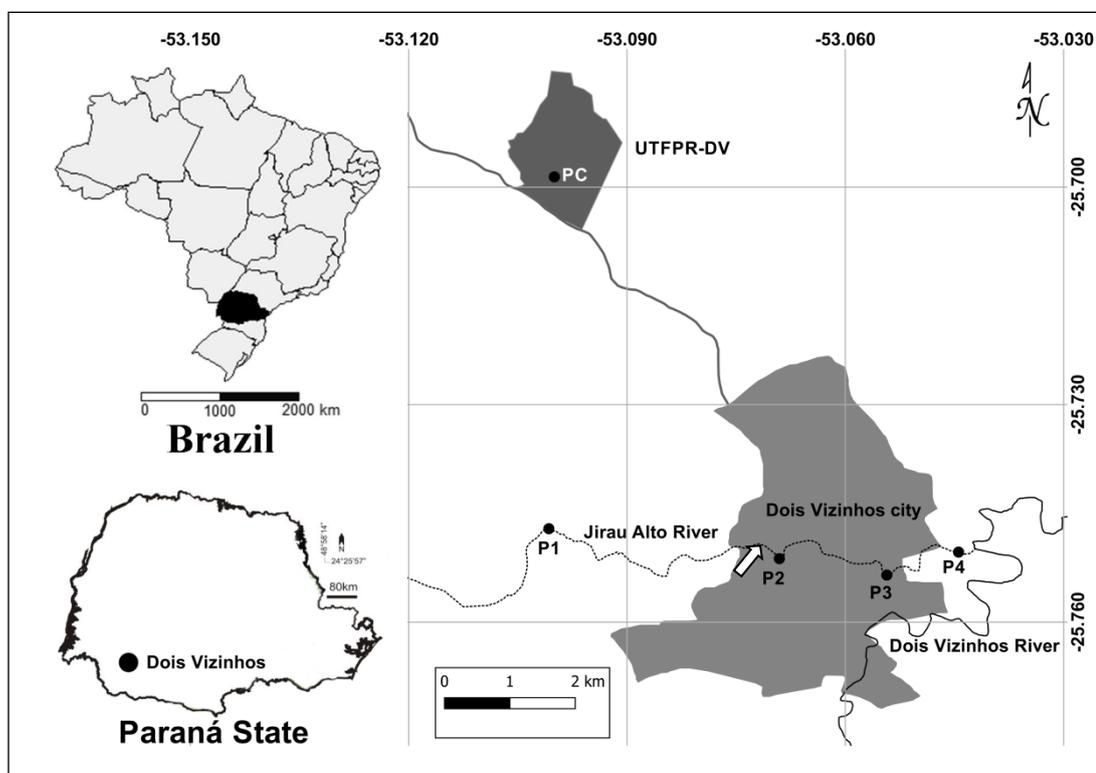


Figura 2 - Área de coleta na cidade de Dois Vizinhos, sudoeste do Estado do Paraná, Brasil, mostrando os pontos de coleta no Rio Jirau Alto (P1, P2, P3, P4 e PC). Nota: PC é o ponto controle. UTFPR-DV: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos. Seta: ponto de captação de água para tratamento e abastecimento público.
Fonte: Fonte: Autoria própria

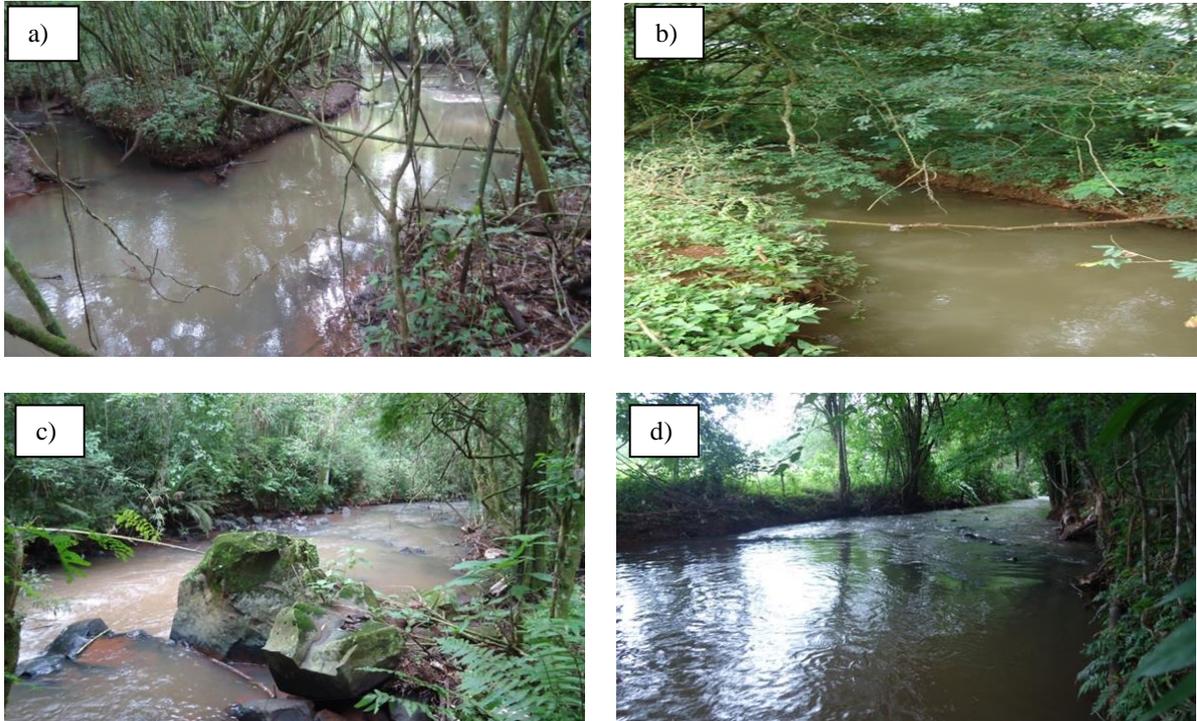


Figura 3 - Diferentes Pontos de coleta do Rio Jirau Alto, figuras a) P1, b) P2, c) P3 e d) P4 da cidade de Dois Vizinhos.
Fonte: Autoria própria



Figura 4 - Foto do Ponto Controle. UTFPR-DV: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos
Fonte: Autoria própria

3.2 PROCEDIMENTO AMOSTRAL

A autorização para coleta dos peixes foi obtida juntamente ao órgão competente com o n°: 50414-1. Este projeto foi aprovado perante a Comissão de Ética no Uso de Animais da UTFPR, com o protocolo n°. 2015-20 (Documentos apresentados em anexo).

A espécie de peixe utilizada como bioindicador foi *Astyanax bifasciatus* (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010), conhecida como lambari de rabo vermelho. A escolha desta espécie deu-se pela sua elevada frequência na região, devido a necessidade de captura de pelo menos oito a 15 exemplares por ponto amostral. No rio Jirau Alto, os peixes foram coletados por meio de rede de espera (aproximadamente 24 horas), durante os meses de Janeiro e Julho de 2016. O número total da espécie coletados, foi de 123 peixes entre as estações do verão, inverno e no ponto controle.

No ponto Controle, as coletas foram realizadas durante o mês de Setembro de 2016, e foi utilizado um covo para a captura dos exemplares.



**Figura 5 - Exemplar da espécie *Astyanax bifasciatus* coletado no rio Jirau Alto, Dois Vizinhos/ PR. Escala: barra= 2 cm.
Fonte: Autoria própria**

Os animais foram transportados vivos até o laboratório de Controle Biológico da UTFPR-DV, colocados em recipientes com aeradores e contendo água do próprio rio.

Os peixes foram anestesiados utilizando cloridrato de benzocaína (250mg/L), segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia (CONCEA, 2013) para evitar o sofrimento dos animais.

Os animais foram identificados por ponto amostral, sendo anotados dados biométricos; em seguida, foi realizada a coleta de sangue para as análises de micronúcleo, alterações morfológicas nucleares e ensaio cometa e após a secção ventral do animal, foi também coletado o fígado para o teste do ensaio cometa.

3.3 TESTE DE MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES (ENA)

Foi utilizado o protocolo descrito por Heddle (1973) e Schmid (1975) para observação da frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas. Este constitui das seguintes etapas: com a ajuda de uma seringa de insulina previamente heparinizada, foi efetuado uma punção cardíaca ou caudal para coleta de sangue. Após, uma gota de sangue foi colocada na superfície de uma lâmina limpa e identificada. Com o auxílio de uma lamínula foi realizado esfregaço, onde o sangue foi espalhando sobre a superfície da lâmina. Após a secagem, cada lâmina foi fixada em etanol 96% por 30 minutos e corada por Giemsa 10% diluído em tampão fosfato (pH 8,6) por 15 minutos, posteriormente, foram lavadas em água corrente e acondicionadas para secagem.

Em microscópio de luz com aumento de 1000x, procedeu-se as análises, varrendo sistematicamente as lâminas até quantificar o número 1000 células por animal. Foram computados como micronúcleos as células que se apresentaram ilesas, assim considerados micronúcleos aqueles que, em relação ao núcleo principal não ultrapassaram 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis e com a mesma cor e refringência do núcleo.

As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias, que não se enquadraram dentro dos parâmetros do micronúcleo, foram quantificadas como alterações morfológicas nucleares e classificadas de acordo com a categorização de Carrasco; Tilbury; Myers, (1990) em lobado, bolha, vacuolado, binucleado e entalhado.

3.3 ENSAIO COMETA

Para o ensaio cometa, foi empregado o protocolo de Speit e Hartmann (1999) com algumas modificações de Ferraro et al. (2004). No teste do ensaio cometa, foram utilizadas amostras de sangue e fígado, realizando-se os seguintes procedimentos:

Com o auxílio de um microhomogeneizador, tanto as células de sangue como as de fígado foram homogeneizadas em soro bovino fetal. Desta solução, foi retirada uma amostra de 15 µL e diluída em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Essa suspensão foi espalhada sobre uma lâmina, contendo uma fina camada de agarose normal, e então foi coberta com uma lamínula. Após esse procedimento, ambas foram levadas à geladeira para polimerização da agarose.

Retirou-se a lamínula, e alocou-se as lâminas em uma solução de lise, para degradação das membranas celulares e nuclear, as quais permaneceram por pelo menos 24 horas a 4°C. Passado o tempo, as lâminas permaneceram por 30 minutos em cuba de eletroforese, imersas em solução de NaOH (300 mM) e 200 mM EDTA, pH>13. Então foi executada a eletroforese por 30 minutos, a 300 mA e 25V.

Em seguida, foi realizada a neutralização em solução de TRIS 0,4 M, pH 7,5 e fixação em etanol 96% por 10 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídeo 10% e analisadas em microscópio de epifluorescência.

Para cada espécime, foram analisados 100 nucleoides, usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, seguindo 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 número da classe, assim a fórmula utilizada foi: $(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)$, onde: A, B, C, D e E correspondem ao número de células em cada uma das classes. Com os valores encontrados para cada indivíduo, foi obtido uma média para cada ponto amostral e para o grupo controle.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS BIOMARCADORES

Os resultados dos biomarcadores foram planilhados e submetidos a testes de pressupostos de normalidade dos resíduos e homocedasticidade, a partir do teste de Shapiro-Wilk e do teste de Levene, respectivamente. Como os dados se mostraram não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney o qual, realiza a comparação múltipla de ranques médios (medianas) para todos os grupos. Todos os testes foram executados com o programa Statistica (STATSOFT, 2007). O nível de significância considerado foi 5%. O programa Excell para Windows foi utilizado para o cálculo das médias e medianas.

4. RESULTADOS

4.1 MICRONÚCLEO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

Por meio dos resultados obtidos no teste do micronúcleo e ENA, foram encontrados eritrócitos que apresentaram micronúcleos bem como alterações no núcleo principal dos mesmos, dessa forma foi possível observar os efeitos mutagênicos e citotóxicos em todos os pontos amostrais e em ambas as estações do ano no rio Jirau Alto. Na comparação entre as estações e o ponto controle, foi observado diferença significativa importante, ficando o ponto controle com a menor frequência de alterações morfológicas e presença de micronúcleo, nos eritrócitos dos peixes da espécie *Astyanax bifasciatus* (fig.6).

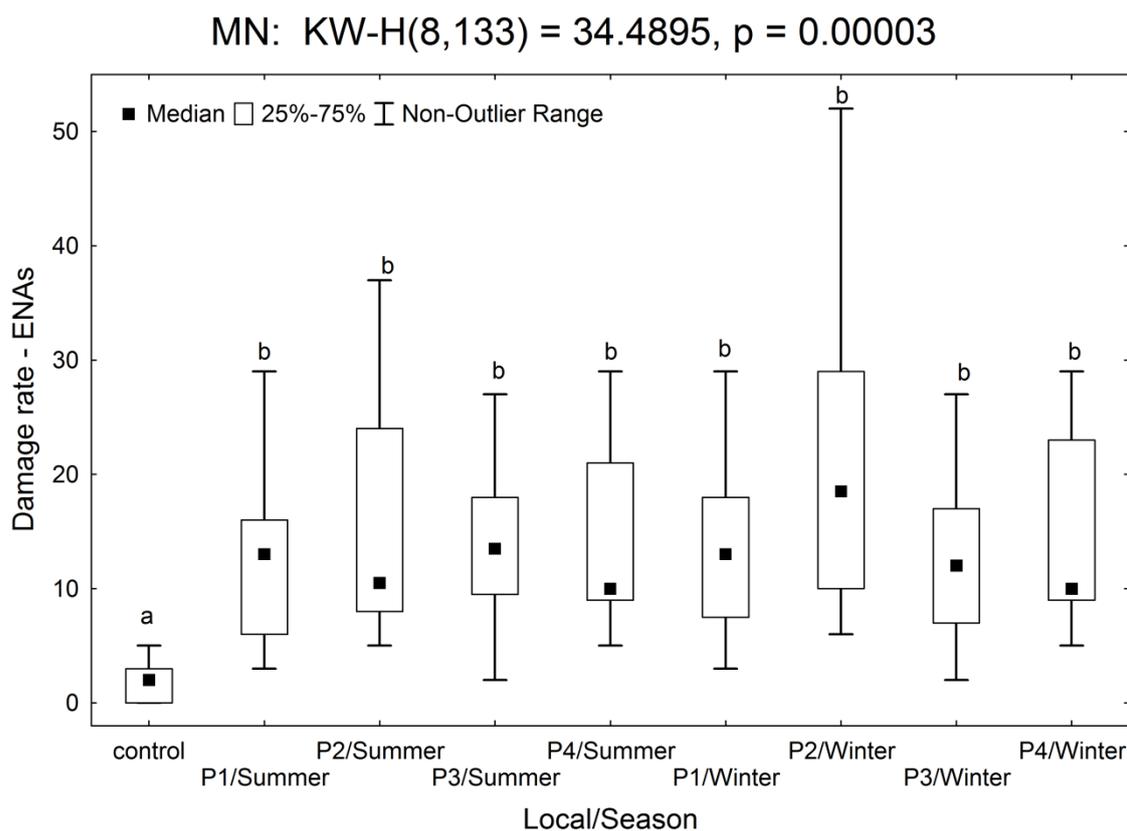


Figura 6 – Frequência de Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares (ENAs) em *Astyanax bifasciatus*, coletados no Rio Jirau Alto nos diferentes pontos amostrais (P1, P2, P3 e P4) da cidade de Dois Vizinhos durante o inverno (winter) e o verão (summer) e Ponto Controle (control). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes sobre as barras (a, b) representam diferença significativa no teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

A Tabela 1 mostra a frequência de cada tipo de alteração nuclear por ponto em cada estação. Observou-se através das análises a maior frequência de micronúcleo principalmente

no ponto P4 e maior frequência do tipo lobado no ponto P2, ambos com média e desvio padrão mais elevada durante o verão, ficando o inverno e o ponto controle com valores inferiores.

Tabela 1 - Média e desvio padrão ($X \pm SD$) encontradas através do teste de micronúcleos e outras anormalidades nucleares nos diferentes pontos amostrais e estações.

Estação/Local	MN	BL	LB	VC	BN	NT	TOTAL
Verão							
P1	1.35±1.37	0.94±2.01	5.65±4.62	0.47±0.72	2.41±4.95	2.12±1.93	12.94±15.60
P2	4.33±2.97	0.44±0.86	10.89±11.44	0.83±1.76	0.11±0.32	0.06±0.24	16.67±17.58
P3	3.75±2.57	0.5±2.00	7.75±6.51	0.56±0.89	2.19±6.47	0.0±0.0	14.75±18.44
P4	6.38±3.12	0.31±0.6	5.94±4.97	0.19±0.4	1.13±1.71	0.0±0.0	13.94±10.80
Inverno							
P1	1.50±2.33	0.19±0,54	2.88±2.57	0.63±1.40	1.12±1.14	0.18±0.35	6.5±8.37
P2	2.16±2.62	1.41±2.53	2.91±3.23	0.75± 0.96	1.58±1.78	0.25±0.62	9.08±11.76
P3	0.7±1.05	0.9±1.37	2.1±2.13	0.4±0.51	0.4±0.51	0.9±0.87	5.3±6.44
P4	0.2±0.41	0.86±1.12	1.53±2.16	0.8±1.56	0.13±0.35	0.4±0.63	3.93±6.26
Controle	0.15±0.38	0.23±0.44	0.46±0.97	0.38±0.65	0.46±0.97	0.23±0.44	1.92±3.84

MN: Micronúcleo, BL: Bolha, LB: Lobado, VC: Vacuolado, BN: Binucleado, NT: Entalhado.

Fonte: Autoria própria

4.2 ENSAIO COMETA SANGUE E FÍGADO

Através dos resultados obtidos com o ensaio cometa, foi possível observar diferentes classes de danos no DNA, os quais são representados na figura 7.

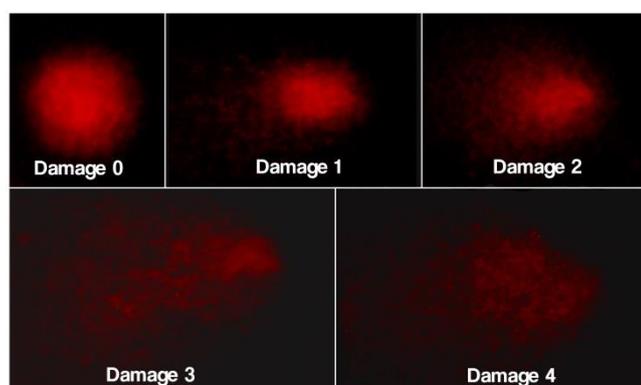


Figura 7 - Classes de danos encontrado no DNA de *Astyanax bifasciatus*, coletados no rio Jirau Alto.

Fonte: Autoria própria

Nas análises do ensaio cometa de sangue, verificou-se que durante o verão todos os pontos apresentaram maior taxa de dano quando comparados com o ponto controle (Fig.8). Já no inverno foi possível observar um padrão não linear: os pontos P2 e P3 se mostraram estatisticamente iguais ao ponto controle enquanto que os pontos P1 e P4 mostraram-se diferentes do controle, com menores taxas de dano.

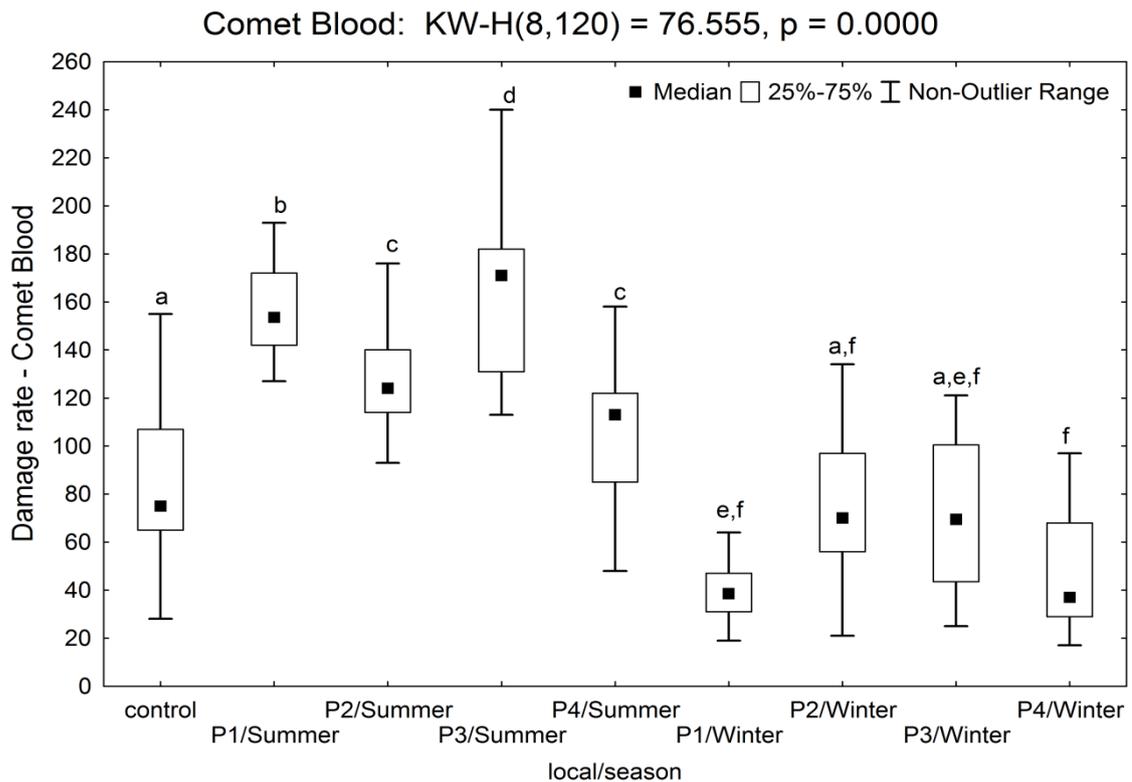


Figura 8 - Ensaio cometa de sangue em *Astyanax bifasciatus*, coletados no Rio Jirau Alto nos diferentes pontos amostrais (P1, P2, P3 e P4,) da cidade de Dois Vizinhos durante o inverno (winter) e o verão (summer) e Ponto Controle (control). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b, c, d, e, f) representam diferença significativa $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria

Na avaliação de genotoxicidade em células do fígado, observou-se diferença estatística entre os pontos estudados e entre as duas estações, verificando menor taxa de dano no período de inverno, estação na qual nenhum dos pontos do Rio Jirau Alto mostrou diferença em relação ao ponto controle. As análises demonstram que no verão, os pontos P1 e P4 foram diferentes estatisticamente do ponto controle, sendo observado maior taxa de dano no DNA nos pontos amostrais (Fig. 6).

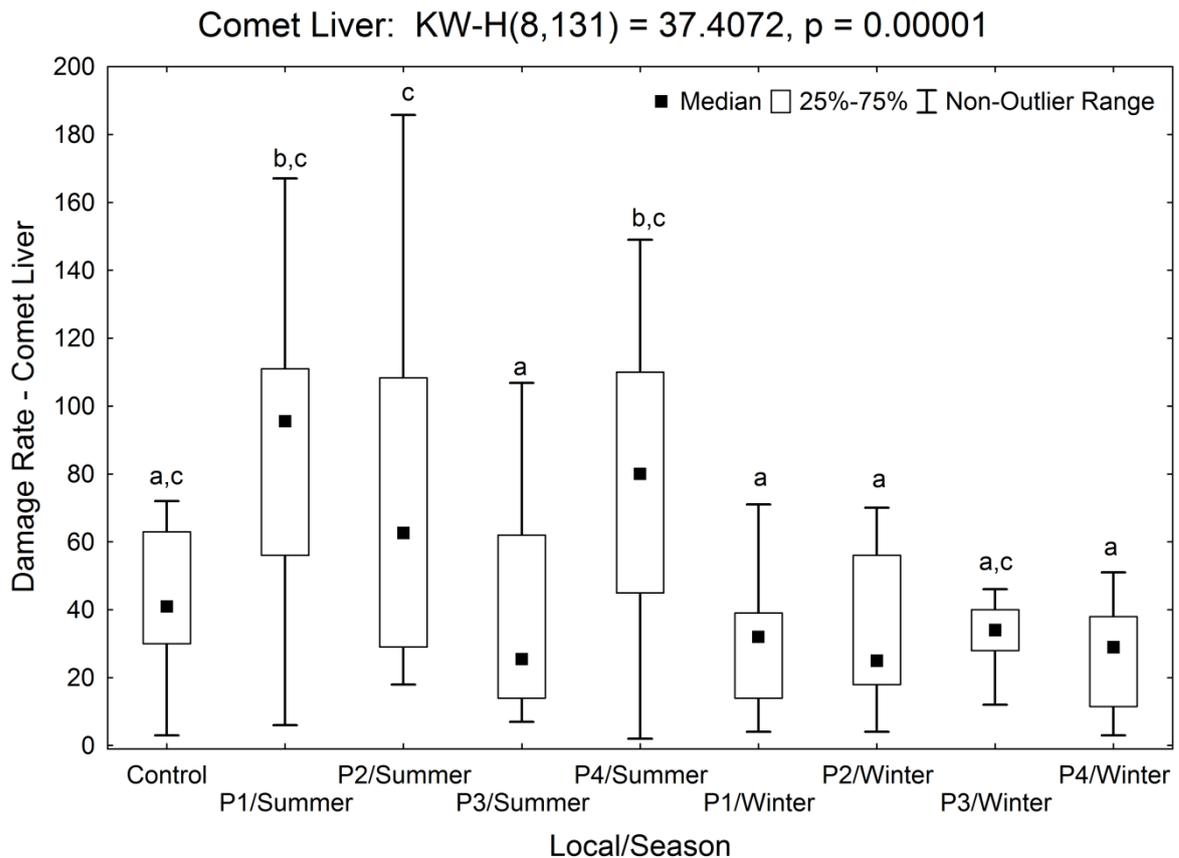


Figura 9 – Frequência do Ensaio cometa do fígado em *Astyanax bifasciatus*, coletados no Rio Jirau Alto nos diferentes pontos amostrais (P1, P2, P3 e P4,) da cidade de Dois Vizinhos durante o inverno (Winter) e o verão (Summer) e Ponto Controle (Control). KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes (a, b, c) representam diferença significativa $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria

No verão, o ponto de amostragem P3, não diferiu do ponto controle. Já o ponto P2 se mostrou estatisticamente igual a todos os pontos da mesma estação e também ao PC.

No inverno, todos os pontos se mostraram iguais estatisticamente quando comparados ao PC. Na comparação entre as estações, durante o verão, somente o ponto P3 mostrou resultados similares aos pontos do inverno. O ponto P1 no período de verão apresentou diferença significativa em comparação com todos os dados avaliados no inverno, bem como o ponto P2 no verão se mostrou igual estatisticamente ao ponto P3 do inverno.

4. DISCUSSÃO

Ambientes aquáticos são afetados por uma grande dispersão de poluentes. Alguns mananciais se destacam por serem receptores de altas concentrações de substâncias tóxicas, providos de áreas urbanas, rurais e/ou industriais (RICHARDS; GLEGG; CULLINANE, 2000). Os peixes são animais muito utilizados em experimentos genéticos e, se expostos a contaminantes, podem apresentar mutações irreversíveis (RUSSO et al., 2004). No entanto, a implicação desses agentes genotóxicos ainda não é completamente compreendida pela comunidade científica (HUSSAIN et al., 2016). Os biomarcadores são ferramentas sensíveis, de fator relevante para detecção de substâncias que tem a capacidade de alterar o material genético (SCALON et al., 2010).

Este estudo se destaca por ser um dos primeiros trabalhos desenvolvidos no rio Jirau Alto para avaliação de toxicidade por meio dos biomarcadores. Esse rio possui grande relevância para a região, uma vez que é utilizado no abastecimento público de grande parte da cidade de Dois Vizinhos, no Sudoeste do Paraná. Por ser um rio de curta extensão, que nasce próximo ao início da zona urbana e deságua na saída da cidade, é possível, desta maneira, avaliar a decorrência exclusiva de efeitos antrópicos ao longo de seu deslocamento por zonas rurais, urbanas e industriais.

Nas análises de mutagenicidade e citotoxicidade por meio do teste de micronúcleo e de alterações morfológicas nucleares observou-se um grande número de anormalidades nucleares nos eritrócitos dos peixes da espécie *Astyanax bifasciatus*. Alterações foram vistas em todos os pontos amostrais ao longo do corpo hídrico estudado, principalmente no verão, isso demonstra o potencial mutagênico desse rio (DUARTE et al., 2012).

As médias e o desvio padrão calculado principalmente nos pontos P2 e P4 para micronúcleos e ENA durante o verão, evidenciou que nessa época do ano ocorreram maiores frequências destas alterações. Também foi possível observar que, através do ensaio cometa do sangue, houve um aumento significativo na taxa de dano durante a mesma estação do que no PC ou no inverno. As anormalidades que demonstram maior frequência são do tipo lobado, o qual evidencia a alta concentração de agentes mutagênicos (GHISI et al., 2014).

Estes resultados podem estar ligados a ocorrência de maior índice de precipitação nesse período, pois nestas condições as substâncias químicas são mais facilmente lixiviadas para dentro do rio (DA SILVA et al., 2014). Segundo Duarte et al., (2012) o qual observou que no período mais chuvoso ocorreu aumento significativo na taxa de dano, quando realizou

análises do teste de ensaio cometa por meio de análises de sangue na espécie *Oreochromis niloticus*.

Foi observado o mesmo padrão de resultado para o teste de ENA, no ensaio cometa de sangue e do tecido hepático. O ponto de coleta P1 se mostrou com maior incidência de danos na estação do verão, provavelmente devido ao volume de chuvas, pois é uma estação com maior concentração de precipitação nessa região, dessa forma explicando o maior índice de dano.

Os trabalhos de Da Silva et al. (2014) e Bueno-Krawczyk et al. (2015) mostram resultado semelhante, com danos mais elevados no período chuvoso, principalmente quando relacionado às áreas rurais como é caso do ponto P1. Esse é um dos fatores mais preocupantes, pois através do uso de defensivos agrícolas, em áreas que são próximas aos mananciais, a chuva se torna um importante condutor para direcionar vários componentes químicos que são prejudiciais a sanidade dos peixes (DA SILVA et al., 2014).

Bueno-Krawczyk et al., (2015) em pesquisa realizada na bacia do Rio Iguaçu, ressaltam que na estação mais pluviosa, foi possível verificar a presença de chumbo e alumínio em áreas próximas a plantações agrícolas, em valores maiores do que o permitido por lei. Estes metais pesados podem ser atribuídos aos pesticidas aplicados nas culturas, tais como os pesticidas inorgânicos e organometálicos.

Nos últimos anos, estudos têm mostrado altas taxas de micronúcleo e alterações morfológicas em peixes que estão em áreas próximas a plantações com risco de contaminação por pesticidas (ATEEQ et al., 2002; ÇAVAS, 2011; DA SILVA et al., 2014).

Em áreas de agricultura convencional, destaca-se o perigo oferecido pelos defensivos agrícolas. Segundo informações cedidas pelo ADAPAR (Agência de Defesa Agropecuária do Paraná), o agroquímico mais utilizado nas lavouras da região é o glifosato (ADAPAR, 2016), que pode ser altamente mutagênico e prejudicial a espécies não alvos, como os peixes (GUILHERME et al., 2010; PRASAD et al., 2009).

Em experimentos realizados em laboratório após a exposição ao herbicida glifosato, foi observada elevada taxa de dano nas células, através do ensaio cometa tanto no fígado como no sangue da espécie *Corydoras paleatus*, mesmo em concentrações muito baixas de glifosato (GHISI; CESTARI, 2013), Também foram encontrados valores elevados em outras espécies de peixe exposto a esse herbicidas (MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014; GUILHERME et al., 2010).

O Brasil está se destacando no ranking mundial desde 2008 no uso de pesticidas. Pesquisas sobre o mercado brasileiro de agroquímicos, mostram um rápido desenvolvimento

nos últimos anos, com crescimento de 190%. Esse valor se mostra maior que o dobro do mercado global, que é de 93% (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Segundo Adapar (2016), através do relatório do Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná – SIAGRO, a cidade de Dois Vizinhos possui uma crescente demanda de insumos agrícolas, sendo que do ano de 2013 a 2015 foi observado um significativo aumento, de 100 toneladas no consumo desses defensivos.

Outro fator importante que aumenta muito o aporte de xenobióticos aos corpos hídricos é a falta de mata ciliar. Esta cobertura vegetal desempenha papel indispensável para conservação do ambiente aquático, através da filtragem de substâncias que são carregadas até o rio (GHISI; OLIVEIRA, 2013). Quando o rio não tem esse suporte total para a retenção, o escoamento de poluentes tóxicos é potencializado para dentro do curso da água. Há autores que defendem com muita propriedade que, na presença da cobertura vegetal, os gastos para tratamento de água seriam bem menores (FAGUNDES; JÚNIOR, 2008).

Através do teste de micronúcleo písceo foi possível observar que todos os pontos no Rio Jirau Alto obtiveram danos expressivos, quando comparados com o PC. Próximos aos pontos de coletas encontram-se vários indícios de poluição, como áreas agrícolas que se situam nas proximidades do ponto P1. Este local é o mais próximo à nascente do rio e a jusante deste ponto se coleta a água para abastecimento público da cidade.

Assim, era de se esperar que o ponto P1 fosse o ambiente mais preservado dentre os avaliados no Rio Jirau Alto. Apesar disto, neste ponto encontram-se atividades agrícolas, além de atividades pecuárias como suinoculturas e pisciculturas próximas do ponto de coleta. Isso pode auxiliar na concentração de poluentes químicos, através da lixiviação do solo (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015).

Com a crescente demanda agrícola e industrial, há um excessivo número de substâncias químicas que são liberadas para os ambientes aquáticos, sem tratamento adequado, esses por sua vez transferidos para os organismos que residem ou fazem uso deste recurso. Estas substâncias desencadeiam papéis determinantes no processo de danos genéticos (VALAVANIDIS et al., 2006). Este fato é preocupante, pois mesmo no ponto mais a montante, anterior à captação de água para tratamento e distribuição urbana, já encontramos indícios de substâncias com potencial genotóxico, especialmente no verão.

O ponto P2 foi o que mostrou as maiores médias de taxas de dano ao material genético e ENAs. Pode-se perceber que no mesmo foram registradas as maiores mensurações de ENA do tipo lobado, em ambas as estações. As alterações do tipo lobado foram caracterizadas por Carrasco et al. (1990) como núcleos com evaginações maiores que as bolhas, em um contínuo

de formas, variando de simples inchaços da superfície nuclear à presença de múltiplos lóbulos formados. Os lobado, juntamente com entalhado são principalmente associados com citotoxicidade (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011), apesar de o seu mecanismo de formação não ser completamente conhecido.

Trabalhos como de Fernandez et al., (2011) e Azevedo et al., (2012) também encontraram lobado como a ENA mais prevalente na comparação de um local referência com relação a um local antropizado sob influência de urbanização. No ponto P2 a água apresenta cor amarelada e com forte odor, que provavelmente está relacionada com a presença de uma indústria frigorífica anterior desse ponto de coleta, que possivelmente faz liberação de cargas orgânicas com sangue e alto teor de gordura (PARDI, 2005). As descargas de resíduos industriais podem conter substâncias tóxicas que causam dano celular e alterações genéticas, afetando a saúde dos peixes (PRAVEENA; SAILAJA; RAO, 2014).

Os resultados obtidos através do ensaio cometa no ponto P2 mostraram danos no sangue e no DNA hepático, evidenciando que nesse local durante o verão foram lançadas substâncias com potencial genotóxico. Os efluentes gerados pela indústria frigorífica possuem componentes orgânicos biodegradáveis, assim contribuem para a presença de alguns nutrientes, além do aumento de nitrogênio nas suas distintas formas. Alguns minerais são disponibilizados durante o processamento e lavagem, oriundos dos equipamentos, como cobre, molibdênio, níquel, titânio e vanádio e que podem estar sendo direcionados ao manancial (TEIXEIRA et al., 2008).

O ponto P3 está situado em um trecho urbano da cidade, localizado dentro do Parque Ecológico Municipal Jirau Alto e foi possível observar evidências de contaminação por águas residuais urbanas. A lei nº. 1311/2007 dá providências relativas ao planejamento e à gestão do território do município de Dois Vizinhos, e segundo o Art. 86 relata que o parque municipal Jirau Alto é uma Zona de Proteção (ZP), portanto deve ser uma área de preservação permanente (DOIS VIZINHOS, 2007). No entanto, através de vários tipos de danos que os mananciais vêm sofrendo ao longo de décadas, um dos impactos ambientais mais constantes está ligado a ação humana (GUEDES, 2011), e principalmente ao descaso das autoridades governamentais.

O Parque Ecológico Municipal Jirau Alto possui área total de 415.840,15 m². A vegetação deste parque é caracterizada como ecotonal entre Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual, ambas pertencente ao Bioma Mata Atlântica. As áreas ecotonais geralmente abrigam maior biodiversidade se comparado aos ecossistemas

particulares e, por isso, são descritas em inúmeros trabalhos como prioritárias à conservação (DOIS VIZINHOS, 1997).

Em particular, no Parque Municipal Jirau Alto as ações conservacionistas são de fatos urgentes, devido ao histórico de degradação desta área. Este parque está dentro da área urbana do município de Dois Vizinhos e convive com inúmeros problemas, tais como invasões, caça, corte ilegal de árvores, introdução de animais domésticos e exóticos invasores, incêndios e poluição. Devido a falta de investimentos, visitas e programas de educação ambiental, a referida UC praticamente não tem mais recebido repasse do ICMS-Ecológico, acarretando no abandono da área (DOIS VIZINHOS, 1997).

Como o desenvolvimento urbano tem aumentado nos últimos anos, há uma grande produção de efluentes lançados pela população através de esgoto doméstico, produzindo um ciclo de contaminação que está refletindo nos animais aquáticos (TUCCI, 2008), e consequentemente influenciando na saúde da população.

No último ponto (P4) alterações de origem genotóxica nas células dos peixes *Astyanax bifasciatus* também foram encontradas. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que este local está situado a jusante da zona urbana, perto da foz do rio Jirau Alto, que desagua no rio Dois Vizinhos. Assim, o rio pode coletar vários tipos de resíduos descartados por toda a cidade, através das estradas rurais, indústrias e esgoto urbano da cidade.

Em relação ao Ponto Controle foi primeiramente selecionado peixes para serem criados em aquários, com água limpa para serem utilizados como controle negativo, para avaliar a presença de alterações genéticas nucleares mesmo em peixes criados em ambientes livre de agentes mutagênicos, entretanto a criação de lambaris em aquários é muito difícil, com baixa sobrevivência (CORREIA, 2008), e os peixes morreram. Alternativamente foi selecionado uma lagoa localizada dentro do campus de Dois Vizinhos da UTFPR. Essa lagoa apresenta condições ecológicas de ambiente preservado, sem indícios de degradação ambiental como por exemplo, grau de trofia do tipo oligotrófico. O local apresenta ainda mata ripária preservada e sem indícios de ação antrópica. Dessa maneira os peixes analisados nesse local não devem estar sofrendo ação de agentes mutagênicos, pelo menos não na mesma intensidade que nos pontos de coleta no rio Jirau alto. Por isso esse ambiente foi considerado por nós como ponto controle negativo para presença de agentes mutagênicos.

No se refere aos testes utilizados, observa-se que o teste de ENA mostrou uma diferenciação bem clara entre o ponto controle e os pontos do Rio Jirau Alto. No entanto, não foi sensível o suficiente para detectar diferenças entre os pontos amostrais neste rio e nem diferença entre as estações.

Segundo (JESUS; CARVALHO, 2008), o teste do micronúcleo é um método bastante eficaz na identificação de danos sobre células eucariontes individuais. Existem vários mecanismos que podem ocasionar a quebra do material genético, oriundos de várias substâncias que estão em constante contato com o meio aquático (RAMSDORF et al., 2012), destacando a provável relação com produtos químicos mutagênicos e citotóxicos encontrados no local (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015).

O biomarcador chamado de teste de micronúcleo só detecta danos ao material genético depois de um ciclo celular completo, após a finalização da mitose. Já o ensaio cometa é apresentado como mais sensível e foi capaz de diferenciar os pontos, além de oferecer uma resposta tecido-específica. Normalmente, para essa técnica são utilizadas células sanguíneas dos peixes, porém outros tecidos também são empregados, como o fígado, que é o órgão principal responsável pelo metabolismo de agentes tóxicos e que tem, o qual tem se mostrado eficiente para detectar a presença de substâncias contaminantes (ROUIMI et al., 2012).

O biomarcador apresentado como ensaio cometa é conhecido como um método que possui várias vantagens para detectar quebra na cadeia de DNA, bem como ligação de DNA-DNA, sítios de ligação no DNA ou ainda DNA-proteínas, causados por agentes físicos ou químicos (JINDAL; VERMA, 2015). Esse método é rápido, relativamente econômico, e bastante sensível para observar, mesmo em baixos níveis, os danos ao material genético. Assim, tem sido amplamente utilizado em pesquisa de monitoramento com diferentes espécies de peixes (JINDAL e VERMA, 2015; BÜCKER et al., 2012).

Na literatura são encontrados dados importantes relatando diferenças significativas entre lugares poluídos e não poluídos com relação à danos genéticos, e seus resultados têm indicado efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água, principalmente em ambientes como os rios, que estão próximos a indústrias, áreas agrícolas e urbanas (FREIRE et al., 2015; BRITO et al., 2012).

O rio Iguaçu é citado como o segundo rio mais poluído do Brasil, sendo o maior rio em extensão no estado do Paraná, o qual está inserido o rio Jirau Alto. Este afluente tem grande importância no entanto, recebe toda a deposição de esgoto, substâncias industriais e agrícolas, pois atravessa diversas margens de produção agrícola do estado. Dessa forma, esse curso da água representa um importante problema na saúde pública (FREIRE et al., 2015). Ainda, o rio Iguaçu possui um alto grau de espécies endêmicas devida sua geografia acidentada, dessa maneira, a poluição se torna mais grave, pois leva espécies endêmicas a extinção.

Assim, trabalhos de biomonitoramento como este revelam importantes fontes de contaminação e mostram os riscos que espécies locais estão expostas, além de apresentar à população humana os perigos no uso dessa água.

5. CONCLUSÃO

Com base na análise de mutagenicidade e genotoxicidade, observou-se uma taxa elevada de danos nos eritrócitos e hepáticos de *Astyanax bifasciatus*, estudados em todos os pontos de amostragens no rio Jirau Alto, demonstrando um grande risco de contaminação neste rio. Os danos genéticos observados estão ligados, devido aos diferentes fatores que favorecem e proporcionam a entrada de poluente no rio, como matas ciliares reduzidas, agricultura intensiva e esgoto ilegal. Este fato é de extrema preocupação, porque o rio Jirau Alto é um dos mais importantes para a cidade de Dois Vizinhos, uma vez que é utilizado para abastecimento público, de água a toda a população urbana.

Desta forma, é muito importante o desenvolvimento de estudos para avaliar os efeitos da poluição ambiental, orientando e buscando a regularização de parâmetros de qualidade dos corpos hídricos, principalmente os que são utilizados para o abastecimento das populações. Deste modo, métodos que utilizam biomarcadores têm ações preventivas, que auxiliam na avaliação de impactos e alertam os órgãos públicos competentes.

Assim, pode-se concluir que o rio Jirau Alto possui um grau elevado de contaminação, devido a presença de diversas fontes de poluição, observadas ao redor do rio, principalmente no ponto P2 o qual se situa próximo a atividades agrícolas, tendo o manejo convencional. Com isso se torna importante a introdução dos agroecossistemas, para preservação da qualidade da água dos rios, pois oferece um sistema agrícola mais ecológico. Portanto se as propriedades ao longo do rio adotassem esse sistema, provavelmente os danos aos peixes seriam bem menores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAPAR, Agência de Defesa Agropecuária do Paraná, 2016. Disponível: http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSV/Agrotoxicos/RESULTADOS_PUBLICADOS/dados_siagro.xls, acesso dia 19 de abril de 2017.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- ATEEQ, B. et al. **Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor.** *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 518, n. 2, p. 135–144, 2002.
- AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. **Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, n. 1, p. 101–105, 2005.
- AZEVEDO, J. D. S.; BRAGA, E. D. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. DE. **Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric index in the Catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast.** *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 60, n. 3, p. 323–330, 2012.
- BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu.** Editora da ed. Maringá, 2012
- BEAL, D. A. **Recursos hídricos : Uso de água na indústria - o caso de dois vizinhos no Paraná-pr.** p. 1–20, 2014.
- BERTI, A. P. et al. **A importância da genética ecotoxicológica.** *SaBios: Revista da Saúde e Biologia*, v. 4, n. 1, p. 52–55, 2009.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. **Micronucleus assay in aquatic animals.** *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.
- BOMBAIL, V. et al. **Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland.** *Chemosphere*, v. 44, n. 3, p. 383–392, 2001.
- BRITO, I. DE A. et al. **Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish.** *Journal of Environmental Monitoring*, v. 14, n. 2, p. 615, 2012.
- BÜCKER, A. et al. **Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene.** *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 7, n. 1, p. 65–73, 2012.
- BUENO-KRAWCZYK, A. C. D. et al. **Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply.** *Chemosphere*, v. 135, p. 257–264, 2015.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, KAREN. L.; MYERS, M. S. **Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological Indicator of Chemical Contaminant Effects.** *Fish Aquat*, v. 47, p. 2123–2136, 1990.

ÇAVAS, T. **In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 6, p. 1431–5, jun. 2011.

CORREIA, T.G. **Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais.** São Paulo, 204f. Dissertação (Mestrado) em Ciências - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, 2008.

CONCEA. **Diretrizes da prática de Eutanásia**, p. 54, 2013.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil – Subordem Characoidei**, Vol. 2-6. São Paulo: Editora Franciscana. 1975.

DA SILVA, J. P. A et al. **Reproductive tactics used by the Lambari *Astyanax aff. fasciatus* in three water supply reservoirs in the same geographic region of the upper Iguazu River.** *Neotropical Ichthyology*, v. 8, n. 4, p. 885–892, 2010.

DOIS VIZINHOS - **Plano de Manejo Girau Alto**, 1997.

DOIS VIZINHOS - 2007. **Providências relativas ao planejamento e à gestão do território do Município.** Disponível em <https://leismunicipais.com.br>, acesso dia 15 de abril de 2017.

DA SILVA, M. D. et al. **Using multibiomarker approach as a tool to improve the management plan for a Private Reserve of Natural Heritage (RPPN).** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 92, n. 5, p. 602–608, 2014.

DUARTE, I. D. et al. **A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo , Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos , mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.** *Revista Brasileira de Biociências*, v. 10, n. 2, p. 211–219, 2012.

DUARTE, P. B. **Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos**, 2011.

FAGUNDES, N. A.; JÚNIOR, C. V. DE S. G. **Diagnóstico ambiental e delimitação de Áreas de preservação permanente em um assentamento rural.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 30, n. 1, p. 29–38, 2008.

FENECH, M. **The in vitro micronucleus test.** Elsevier, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. **Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes.** *Nature Protocol*, v. 2, p. 1084 a 1104, 2007.

FERNANDEZ, W. S. et al. **Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidade) from two beaches in southeast of Brazil.** *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 59, n. 2, p. 163–169, 2011.

FERRARO, V. M. et al. **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.** Genetics and Molecular Biology, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FREIRE, C. A. et al. **A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil.** Environmental Science and Pollution Research, 2015.

FREITAS C, E, C.; SIQUEIRA-SOUZA, F, K, S. **O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica.** Revista Agroambiental, p. 39–45, 2009.

GARAVELLO, J. C.; SAMPAIO, F. A A. **Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçú, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae).** Brazilian journal of biology, Revista brasileira de biologia, v. 70, n. 3 Suppl, p. 847–865, 2010.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. DE C. **Evidence of Contamination in the Main Body of the Public Water Supply of Campo Mourão-Pr : an Analysis.** Rev. Saúde e Biol., v. 8 (2), p. 13–22, 2013.

GHISI, N.; 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.

GHISI, N. D. C. et al. **In Situ Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 93, n. 6, p. 699–709, 2014.

GHISI, N. DE C.; OLIVEIRA, E. C. DE; PRIOLI, A. J. **Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency.** A systematic and meta-analytic review. Chemosphere, v. 145, p. 42–54, 2016.

GOOGLE EARTH MAPS, 2017. Disponível: <https://maps.google.com.br>. Acesso dia 28 de abril de 2017.

GUEDES, J. D. A. **Poluição de rios em áreas urbanas.** Ateliê Geografico, v. 5, n. 2, p. 212–226, 2011.

GUILHERME, S. et al. **European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - A glyphosate-based herbicide.** Mutagenesis, v. 25, n. 5, p. 523–530, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; VILLAR, S.; PLAVAN, A. A. **Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay).** Marine Pollution Bulletin, v. 91, n. 2, p. 518–523, 2014.

HEDDLE, J. A. **A rapid in vivo test for chromosomal damage.** Mutation research, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.

- HUSSAIN, B. et al. **Variation in genotoxic susceptibility and biomarker responses in *Cirrhinus mrigala* and *Catla catla* from different ecological niches of the Chenab River.** Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n. 14, p. 14589–14599, 2016.
- JAGER, T. et al. **Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: Applications and outlook.** Ecological Modelling, v. 280, p. 140–147, 2014.
- JESUS, B. DE T.; CARVALHO, DE 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.
- JINDAL, R.; VERMA, S. **In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 118, p. 1–10, 2015.
- JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. **Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente.** Embrapa- Meio ambiente, p. 5, 2005.
- LEITE, K. A. DA S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAM, A. **Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpurea* através do ensaio cometa.** IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, v. 9, n. 11, p. 399–417, 2013.
- MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. **Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species.** Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, v. 133, n. 1, p. 151–160, 2002.
- MARTINS, L.; PAZ, V. A.; BRENTANO, D. M. **Avaliação da Geração de Micronúcleo em Junvenis de *Centropomus paralellus* (Rabalo-Peva) Expostos a Diferentes Concentrações Salinas.** Revista Técnico Científica, v. 2, n. 1, p. 13–16, 2010.
- MORENO, N. C.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. **Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*.** Environmental toxicology and pharmacology, v. 37, n. 1, p. 448–54, 2014.
- PARDI, M. C.; Santos, I. F. dos; SOUZA, E. R. de; PARDE, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** 2a ed. Vol. I, Goiânia: Ed da UFG, 2005 624p.
- PICADO, A. et al. **Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings.** Environmental toxicology, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.
- PIGOSSO, M. et al. **Diagnóstico Ambiental da Bacia do Rio Jirau Alto - Dois Vizinhos - Paraná.** Revista Eletrônica do Curso de Geografia - Campus Jataí (UFG), v. 13, p. 175–193, 2009.
- POLARD, T. et al. **Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France.** Aquatic Toxicology, v. 101, n. 1, p. 126–134, 2011.

- PRASAD, S. et al. **Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice.** Journal of toxicology, v. 2009, n. 5, p. 308985, 2009.
- PRAVEENA, M.; SAILAJA, M. C.; RAO, K. J. **Fish, laboro hita (hamilton).** v. 1, n. 4, p. 647–656, 2014.
- RABITTO, I. D. S. et al. **Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon.** Environment International, v. 37, n. 1, p. 56–65, 2011a.
- RABITTO, I. D. S. et al. **Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon.** Environment International, v. 37, n. 1, p. 56–65, 2011b.
- RAMSDORF, W. A. et al. **Handling of astyanax sp. For biomonitoring in Canguiri farm within a fountainhead (Ira River environment preservation area) through the use of genetic biomarkers.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 184, n. 10, p. 5841–5849, 2012.
- RICHARDS, J. P.; GLEGG, G. A.; CULLINANE, S. **Environmental regulation: Industry and the marine environment.** Journal of Environmental Management, v. 58, n. 2, p. 119–134, 2000.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E; ROCHA, M. M. **Pesticide use in Brazil and problems for public health.** Caderno de Saúde Pública, v. 30, n. 7, p. 1360–1362, 2014.
- ROUIMI, P. et al. **Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cell defence systems.** Toxicology in Vitro, v. 26, n. 5, p. 718–726, 2012.
- RUSSO, C. et al. **Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 57, n. 2, p. 168–174, 2004.
- SCALON, M. C. S. et al. **Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish.** Brazilian journal of biology. Revista brasileira de biologia, v. 70, n. 4 Suppl, p. 1217–1222, 2010.
- SCHMID, W. **The micronucleus test.** Mutation research, v. 31, n. 1, p. 9–15, fev. 1975.
- SILVA DE ASSIS, H. C. et al. **Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure.** Toxicon, v. 66, p. 25–30, 2013.
- SINGH, N. P. et al. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental cell research, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. **The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** In: HENDERSON, D. S. (Ed.). . Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems. 113. ed. Totowa: Human Press, 1999. p. 203–211.
- STATSOFT, I. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0, 2007.

TEIXEIRA, R. M. et al. **Remoção de nitrogênio de efluente agroindustrial utilizando biorreatores**. Acta Scientiarum - Technology, v. 30, n. 2, p. 209–213, 2008.

TRUJILLO-JIMÉNEZ, P. et al. **Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860)**. Ecological Indicators, v. 11, n. 6, p. 1636–1646, 2011.

TUCCI, C. E. M. **Águas urbanas**. Estudos Avançados, v. 22, n. 63, p. 97–112, 2008.

VALAVANIDIS, A. et al. **Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, n. 2, p. 178–189, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

ANEXOS

ANEXO 1- AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES



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: 50414-1	Data da Emissão: 02/09/2015 15:43	Data para Revalidação*: 01/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Elton Celton de Oliveira	CPF: 039.062.859-01
Título do Projeto: A utilização de peixes como bioindicadores para avaliar um gradiente de poluição aquática no sudoeste do estado do Paraná	
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	Coleta mensal de espécimes	09/2015	10/2016
2	Triagem de material em laboratório	09/2015	10/2016
3	Processamento de amostras biológicas em laboratório	10/2015	12/2016
4	Divulgação dos resultados	06/2016	06/2017

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 passada, 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 NÃO exige 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 de terra indígena (FUNAI), 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 ICMBio n° 03/2014 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).
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	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	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 .
8	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.

Outras ressalvas

1	Reiteramos nesta ressalva que, conforme preenchido/solicitado pelo pesquisador, o mesmo declarou que não pretende coletar espécies ameaçadas de extinção. A coleta de espécimes representantes de espécies constantes em listas oficiais de espécies ameaçadas, seja em âmbito federal, estadual, distrital ou municipal não esta coberta por esta autorização, sujeitando os infratores aas penalidades previstas no Decreto Federal 6514/08, sem prejuízo de outros instrumentos legais cabíveis.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Maria Antônia Michels de Souza	colaboradora	889.023.409-10	11.121.962-1 SSP-PR	Brasileira
2	Alexandre Augusto Auache Filho	Colaborador	096.118.329-23	98199721 SESP-PR	Brasileira
3	Fernanda Ferrari	colaboradora	037.942.219-07	68087414 SSP-PR	Brasileira
4	Luis Fernando Fávoro	colaborador	629.110.749-04	14560787 SSP-SP	Brasileira
5	NÉDIA DE CASTILHOS GHISI	Colaboradora	049.814.579-44	88051343 SESP-PR	Brasileira
6	Ricardo Yují Sado	Colaborador	281.002.768-46	22.446.506-5 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 72416734





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: 50414-1	Data da Emissão: 02/09/2015 15:43	Data para Revalidação*: 01/10/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Elton Celton de Oliveira	CPF: 039.062.859-01
Título do Projeto: A utilização de peixes como bioindicadores para avaliar um gradiente de poluição aquática no sudoeste do estado do Paraná	
Nome da Instituição : Universidade Tecnológica Federal do Paraná	CNPJ: 75.101.873/0006-02

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	DOIS VIZINHOS	PR	Bacia do Rio Jirau Alto	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Gymnotiformes (*Qtde: 30), Cypriniformes (*Qtde: 50), Cyprinodontiformes (*Qtde: 100), Atheriniformes (*Qtde: 10), Synbranchiformes (*Qtde: 10), Characiformes (*Qtde: 600), Siluriformes (*Qtde: 200), Perciformes (*Qtde: 100)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Rede de emalhar (emalhe de deriva, de fundo, malhadeiras, caceio, feiteiras, tresmalhos e caçoeira), Outros métodos de captura/coleta(Peneira), Armadilha (covo, manzuá, potes para polvos, substrato específico, manilha e variações)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. 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: 72416734



Página 2/3

ANEXO 2: PARECER DE APROVAÇÃO NO CEUA – UTFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Dois Vizinhos
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	A utilização de diatomáceas e peixes como bioindicadores para avaliar um gradiente de poluição aquática no sudoeste do estado do Paraná
Área Temática:	Ciências Ambientais
Pesquisador / Professor:	Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira
Instituição:	UTFPR/ Dois Vizinhos
Financiamento:	CNPQ - MCTI/CNPQ/Universal 14/2014; Processo: 455513/2014-7
Versão:	01

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2015-020
<p>Apresentação do Projeto: O projeto em apreciação visa avaliar um pressuposto gradiente de poluição em ambiente dulcícola (incluindo, em parte, zona urbana) usando peixes e diatomáceas como bioindicadores.</p>	
<p>Objetivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caracterizar o ambiente a partir dos dados abióticos de forma comparativa ao longo do pressuposto gradiente de poluição aquática; - Avaliar composição e estrutura de peixes e diatomáceas ao longo do gradiente; - Averiguar a consonância entre os dados bióticos e abióticos ao longo do gradiente; - Estimar o estresse ambiental a partir de biomarcadores genéticos, teciduais, celulares e hematológicos dos peixes. 	
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>Estudos que demonstram a real situação em termos físicos, químicos e de diversidade biológica, principalmente em áreas de preservação ambiental, têm relevância considerável, uma vez que podem retratar as condições dos recursos naturais, sejam terrestres ou aquáticos. Tais recursos, por consequência, têm seus efeitos em comunidades humanas, o que é automaticamente associado à saúde individual e também ao bem-estar coletivo. Principalmente em ambientes adjacentes, ou muito próximos, a aglomerações humanas, uma variedade de substâncias de origem antrópica, com potencial efeito mutagênico, genotóxico e histopatológico, pode atingir rios e lagos. Nestas situações, virtualmente todos os organismos residentes, ou que dependam em algum grau destes corpos d'água, poderão sofrer diretamente de tais efeitos.</p> <p>Neste contexto, o estudo proposto é justificado visto a necessidade de monitoramento de ambientes de alta influência em comunidades humanas e sua qualidade de vida. Neste caso em particular, o corpo hídrico é fonte de</p>	



abastecimento público de água do município de Dois Vizinhos.

Muito embora seja revelado no projeto que os animais coletados passarão por estresse mínimo pelo próprio evento da captura, o proponente e sua equipe tomarão medidas atenuantes em dois momentos. Primeiramente, ainda em campo, os peixes serão acondicionados em caixas termicamente isolantes de grande volume, contendo água da própria localidade e aeradas artificialmente. Ou seja, certas condições químicas e físicas serão mantidas próximas das do ambiente original. Segundo, em laboratório, os animais serão anestesiados com cloridrato de benzocaína ainda antes de serem manipulados para a anotação de seus dados corporais. Para a eutanásia (necessária para a tomada de tecidos corporais para os testes com marcadores moleculares), os peixes serão imersos numa solução de benzocaína alcoólica tamponada até cessarem os movimentos operculares (dentro das diretrizes de prática de eutanásia do CONCEA).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:

A metodologia a ser aplicada é compatível com os objetivos da proposta e também encontra-se dentro dos parâmetros usualmente aplicados naquela área específica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados à presente solicitação os seguintes termos e documentos: 1) o requerimento preenchido e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto; 2) o formulário unificado de encaminhamento ao CEUA-UTFPR; 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) a declaração de não início do projeto (com assinatura e data); 5) a cópia da autorização de coleta e transporte do SISBIO, número 50414-1 de 02/09/2015; 6) o registro de projeto junto à DIRPPG-DV.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A metodologia proposta segue parâmetros usualmente aplicados na área específica. Os procedimentos para eutanásia dos peixes estão de acordo com as diretrizes do CONCEA. Todos os documentos exigidos foram apresentados e em ordem.

Situação do Parecer:

O parecerista é favorável à aprovação da proposta.

Considerações Finais a Critério da CEUA:

Todos os membros presentes na reunião de 08 de outubro de 2015 acompanharam a decisão do parecerista.



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A utilização de diatomáceas e peixes como bioindicadores para avaliar um gradiente de poluição aquática no sudoeste do estado do Paraná", protocolo nº 2015/020, sob a responsabilidade de Elton Celton de Oliveira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 08/10/2015.

Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO:	50414-1 de 02/09/2015
Atividades:	Captura e coleta de espécimes.
Espécies/Grupos Taxonômicos:	Variadas espécies de peixes Actinopterygii, provavelmente pertencentes às seguintes Ordens: Gymnotiformes, Cypriniformes, Cyprinodontiformes, Atheriniformes, Synbranchiformes, Characiformes, Siluriformes e Perciformes.
Peso/Idade:	Indefinidos
Local(is):	Rio Jirau Alto, município de Dois Vizinhos, Paraná.

Dois Vizinhos, 08 de outubro de 2015.

Assinado por:
 Gustavo Sene Silva

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná