

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

LUIZ FERNANDO DE ABREU MARION

O USO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS EM *ASTYANAX AFF. PARANAÉ* (PISCES) PARA AVALIAR A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO PARANÁ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2012

LUIZ FERNANDO DE ABREU MARION

O USO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS EM *ASTYANAX AFF. PARANAË* (PISCES) PARA AVALIAR A CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO PARANÁ

Trabalho de conclusão de curso apresentado à graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Campo Mourão, como requisito parcial da disciplina de TCC2.

Orientador: Prof. Dr. Elton Celton Oliveira

CAMPO MOURÃO
2012



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Nome da Diretoria
Nome da Coordenação
Nome do Curso



TERMO DE APROVAÇÃO

A ABNT NBR ISO 14.001 COMO FERRAMENTA PARA O CONTROLE OPERACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS: UM ESTUDO DE CASO NA UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CÂMPUS CAMPO MOURÃO

por

LUIZ FERNANDO DE ABREU MARION

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 8 de Outubro de 2012 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Elton Celton Oliveira
Prof.(a) Orientador(a)

Prof.(a) Dr.(a) Elizabete Satsuki Sekine

Prof. MSc. Paulo Agenor Alves Bueno

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

A Deus em primeiro lugar, a minha família, aos meus amigos, e ao meu orientador e amigo Elton Celton Oliveira e a sua esposa Nédia de Castilhos Ghisi.

AGRADECIMENTO

Para a realização deste trabalho existiram muitas pessoas que sempre estiveram ao meu lado me dando suporte, força, e me ajudando em momentos difíceis. Dentre essas pessoas gostaria de agradecer:

- Em primeiro lugar a minha família, em especial meu pai, minha mãe, minha irmã e avós.
- Também gostaria de agradecer três pessoas que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho, que são meu orientador Prof. Dr. Elton Celton Oliveira, sua esposa Nédia Castilhos Ghisi e ao Prof. Dr. Marcelo Galeazzi Caxambu, estas, que sempre em momentos de dificuldade me direcionaram e sanaram dúvidas.
- E agradeço também o suporte logístico fornecido pelo Instituto Chico Mendes da Reserva Biológica das Perobas; o apoio financeiro da Fundação Araucária; a Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI); a CAPES (PROEX), entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos.

O inimigo mais perigoso que você poderá encontrar será sempre você mesmo.

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

MARION, Luiz F. A. O uso de biomarcadores genéticos em *Astyanax aff. paranae* (Pisces) para avaliar a contaminação aquática na região centro-oeste do Paraná. 2012. 45p. Trabalho de conclusão de curso do curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2012.

Este trabalho avaliou a taxa de danos nucleares e a fragmentação do DNA em eritrócitos do lambari *Astyanax aff. paranae*, através do Teste do Micronúcleo Pisceo e do Ensaio Cometa, respectivamente. Foram realizadas duas coletas de peixes, no inverno e verão de 2011, em três pontos distintos, sendo dois no rio do Campo (a jusante e a montante do município de Campo Mourão – PR), e um na Reserva Biológica das Perobas, em Tuneiras do Oeste – PR (REBIO). Em laboratório, os exemplares foram anestesiados e, posteriormente, tiveram uma amostra de sangue retirada por punção cardíaca. Para o teste do Micronúcleo, a amostra de sangue foi fixada em lâmina, corada com Giemsa 10% e, em seguida, avaliados 1000 eritrócitos. Para o Ensaio Cometa, a amostra de sangue foi tratada de modo a remover as membranas das células, para posterior corrida eletroforética e coloração de brometo de etídeo. Em seguida foram contadas 100 células, onde foi avaliada a intensidade de fragmentação do DNA de cada célula. A partir da ANOVA, pode-se constatar que o ponto situado na REBIO no verão apresentou a maior taxa de aberrações nucleares, e os pontos a montante no verão e a jusante nas duas estações obtiveram valores intermediários. Os menores valores na taxa de dano nuclear foram verificados na REBIO e montante durante o inverno. Para o Ensaio Cometa, verificou-se através da ANOVA, que os maiores valores de fragmentação no DNA, foram observados no ponto jusante verão e os menores nos pontos da REBIO verão e inverno. Esses resultados sugerem que a REBIO está sofrendo uma influência de substâncias que promovem citotoxicidade, enquanto que os pontos a jusante e montante provavelmente sofrem mais com ações de substâncias genotóxicas.

Palavras-chave: Teste do Micronúcleo Pisceo, Ensaio Cometa, biomarcador, bioindicador, poluição.

ABSTRACT

MARION, Luiz F. A. Use of genetics biomarkers on *Astyanax aff. paranae* (Pisces) to assess aquatic contamination in center-west region Paraná State, Brazil. 2012, 45p. Graduate conclusion study for Environmental Engineer course of Federal Technologic University of Paraná (UTFPR), Campo Mourão Campus, Paraná, Brazil.2012.

This study aims to assess the nuclear damage rate and the DNA fragmentation in erythrocytes from lambari *Astyanax aff. paranae*, by Piscine Micronucleus Test and Comet Assay. There were performed two fish collections, in winter 2011 and summer 2011, and in three sampled sites, two of these in Campo River (upstream and downstream of Campo Mourão city) and the third site was located in Perobas Biological Reserve (REBIO), in Tuneiras do Oeste city- Paraná State. In laboratory, the specimens were anaesthetized for blood collection by cardiac puncture. For Piscine Micronucleus Test, the blood samples were fixed in microscope lamina, stained with 10% Giemsa, and were computed 1000 erythrocytes. For Comet Assay, the blood samples were treated to remove the cell membrane, following the electrophoresis in alkaline conditions and staining with ethidium bromide. There were computed 100 cells, assessing the DNA fragmentation intensity. Through ANOVA, we can observe that the sample site in Biological Reserve during summer presents the highest nuclear alteration rate and the sites upstream in summer and downstream in both seasons showed intermediary values. The smallest values of nuclear damage rate were found in REBIO and upstream in winter. In Comet Assay, it was verified through ANOVA, that the highest values of DNA fragmentation were found in downstream summer and the smallest values in REBIO summer and winter. These outcomes suggest that the REBIO are suffering an influence of substances that cause cytotoxicity, while the sampled sites in downstream and upstream of Campo Mourão are affected probably for substances with genotoxic action.

Key words: Piscine Micronucleus Test, Comet Assay, bioindicator, pollution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Astyanax aff. paranae</i> coletado no rio do Campo. Nota: barra=1cm.	17
Figura 2 - Área de estudo com a localização dos pontos amostrais. Dois pontos foram alocados no rio do Campo (jusante e montante do município de Campo Mourão-PR) e outro no córrego Concórdia (na REBIO das Perobas – municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte-PR).	19
Figura 3 - Imagem do córrego Concórdia, um riacho oligotrófico onde foram realizadas coletas na REBIO das Perobas, Tuneiras do Oeste e Cianorte-PR.....	20
Figura 4 - Esquema para confecção de lâminas do teste do micronúcleo pisco e aberrações morfológicas nucleares. Realizou-se uma punção cardíaca, pingou-se uma gota de sangue em uma lâmina (A), com o auxílio de uma lamínula fez-se o esfregaço (B, C e D).....	21
Figura 5 - Tipos de alterações registradas no teste das aberrações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes. Fonte: Jiraungkoorskul; Sahaphong (2007).	22
Figura 6 - Esquematização dos Procedimentos adotados para o Ensaio Cometa....	23
Figura 7 - Classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, e suas classes de dano: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo, apoptose).	23
Figura 8 - Fotos de alterações morfológicas nucleares. a: núcleo normal; b: blebbed (não é micronúcleo, pois ainda apresenta uma ponte de cromatina ligando ao núcleo principal); c-f: notched; g: lobed; h: binucleada; i: Blebbed.	26
Figura 9 - Média e intervalo de confiança da taxa de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de <i>Astyanax aff. paranae</i> , considerando-se conjuntamente os pontos amostrais e as estações de ano. a, b, c = representação do resultado do teste das mínimas diferenças significativa de Fisher.	27
Figura 10 - Média e intervalo de confiança da taxa de fragmentação de DNA em eritrócitos de <i>Astyanax aff. paranae</i> , considerando-se conjuntamente os pontos amostrais e as estações de ano. a, b, c = representação do resultado do teste das mínimas diferenças significativa de Fisher.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teste LSD realizados a partir das taxas de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae* coletados no verão e no inverno. Entre parênteses: valores médios de cada tratamento (T). Em vermelho, valores significativos ($p < 0,05$).....27

Tabela 2- Teste das mínimas diferenças significativas de Fisher realizados com os dados do Ensaio Cometa de *Astyanax aff. paranae* coletados no verão e no inverno. Entre parênteses, valores médios de cada tratamento (T); Em vermelho, valores significativos ($p < 0,05$).....31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 ESPÉCIE ESTUDADA	17
4.2 ÁREA DE ESTUDO.....	17
4.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL	19
4.4 ANÁLISE DE DADOS.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PISCEO	25
5.2 ENSAIO COMETA	30
6 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO I – METODOLOGIA COMPLETA PARA A REALIZACAO DO TESTE DO MICRONÚCLEO PISCEO	43
ANEXO II - METODOLOGIA COMPLETA PARA A REALIZACAO DO ENSAIO COMETA.....	43
ANEXO III – PROTOCOLO COMPLETO PARA A PREPARACAO DA AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSAO (LMP).....	44
ANEXO IV – PROTOCOLO COMPLETO PARA A PREPARACAO DA AGAROSE NORMAL.....	44

1 INTRODUÇÃO

Segundo Amorim (2003), o despejo de 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. 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.

Um exemplo disso ocorre na região centro-oeste do Estado do Paraná, mais precisamente no município de Campo Mourão (IBGE, 2010), onde se verifica o lançamento de uma variedade de agrotóxicos, bem como de efluentes industriais e/ou urbanos nos corpos hídricos (PAGOTTO et al., 2009). Este fato se deve ao elevado potencial agrícola da região (solo muito fértil) e pela localização privilegiada em termos comerciais e industriais no estado. Segundo Jonsson et al. (2005), estes efluentes dotados de substâncias potencialmente tóxicas, ou ditas xenobióticas, acabam alcançando os rios da região por lixiviação da chuva ou mesmo por descaso da população e das autoridades.

Deste modo, é importante verificar se a qualidade da água do Rio do Campo, no município de Campo Mourão – PR, está sofrendo alterações mediadas por poluentes. Os métodos analíticos tradicionais capazes de avaliar pesticidas organofosforados e carbamatos em água são realizados por cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou espectrofotometria de massa (MS) (LACORTE et al., 1995). No entanto, esses métodos de análise exigem mão-de-obra especializada e apresentam alto custo operacional, o que torna inviável sua aplicação em larga escala (ALVES, 2000).

Para realização de avaliações eficientes, é de fundamental importância a aplicação de análises integradas da qualidade da água, unindo as respostas das metodologias tradicionais de avaliação aos aspectos biológicos do sistema (ARIAS, 2007). Segundo Arias (2007) tradicionalmente, as técnicas para avaliação destes impactos utilizando bioindicadores vêm sendo divididas em duas abordagens principais: aquelas associadas aos níveis superiores de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas ou no nível individual – que trata de

alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimentos reprodução, alimentação, alterações bioquímica e fisiológica – que inclui alterações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular e em atividades enzimáticas.

Deste modo, um método bastante eficiente para verificar alterações ambientais em corpos hídricos é através do uso de bioindicadores. Este termo refere-se ao organismo do qual se está obtendo as informações das condições ambientais do seu habitat (ARIAS, 2007).

Segundo Whitfield e Elliott (2002), os bioindicadores são mais sensíveis e consistentes para avaliação de impactos ambientais do que análises físicas e químicas da água, dando uma resposta a longo prazo. Um exemplo de um bom bioindicador são os peixes, pois bem como os mamíferos podem sofrer bioacumulação, respondem a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 (GOKSØYR et al. 1991).

Para Van Gestel e Van Brummelen (1996), o termo bioindicador não deve ser confundido com biomarcador, uma vez que biomarcador define-se como qualquer resposta biológica a uma substância química presente no ambiente, possível de ser medida dentro do organismo ou em seus produtos (pêlos, urina, fezes etc.), indicando um desvio da normalidade encontrada naqueles organismos não expostos ao elemento/substância. Ainda, biomarcadores podem ser usados para verificar o estado de saúde dos organismos ou servirem como sinais de alertas de risco ambiental (PAYNE et al.1987).

Um biomarcador proposto por Schmid (1975) e Heddle (1973) consiste em um tipo de ensaio que permite a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação de umas estruturas citoplasmáticas conhecidas pelos hematologistas como corpúsculos de Howell-Jolly, os quais são encontrados em populações celulares em divisão. Estas estruturas receberam o nome de micronúcleos.

Hoofman e De Raat (1982), tomando por base o teste do micronúcleo originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos, introduziram-no nos estudos de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Esta modificação do teste original passou a ser conhecida como “*Piscine Micronucleus Test*” (Teste do Micronúcleo Písceo) e adotado neste trabalho de forma mais generalista como teste das aberrações nucleares em eritrócitos de peixes. Isto se deve ao fato de que os micronúcleos aparecem em uma

baixa frequência nas células de sangue de peixes em comparação com outros tipos de alterações nucleares, como por exemplo, as alterações morfológicas nucleares. Para estabelecer a taxa de dano de uma determinada população de peixes, diferentes autores têm somado as alterações morfológicas nucleares aos micronúcleos nas suas contagens de toxicidade. Desta forma, avalia-se com maior grau de precisão a toxicidade dos peixes frente a diferentes contaminantes (GHISI et al., 2011).

Outro biomarcador muito utilizado é o Ensaio Cometa, também conhecido como SCGE (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*). Esta é uma técnica capaz de detectar dano ao DNA em células individualizadas (SPEIT et al., 1999).

O ensaio cometa combina a simplicidade de técnicas bioquímicas para detecção quebras na fita simples de DNA. As vantagens do teste SCGE incluem o seu desempenho simples e rápido, a sua sensibilidade para a detecção de danos ao DNA, a análise dos dados ao nível individual de célula, a utilização de amostras extremamente pequenas, e sua aplicabilidade para virtualmente qualquer população de células eucarióticas, além do custo para realização do ensaio ser relativamente baixa. O teste tem aplicações difundidas nas áreas de genotoxicidade, biologia molecular, biomonitoramento ambiental e monitoramento da população humana (SPEIT et al., 1999).

O homem apresenta um comportamento paradoxal em relação ao uso dos recursos hídricos, uma vez que os utiliza para finalidades essenciais para a manutenção do seu estilo de vida e, por outro lado, polui como consequência destas próprias atividades. Entende-se como poluição, a adição de substâncias ou de formas de energia que, direta ou indiretamente, alterem a natureza do corpo de água de uma maneira tal que prejudique os legítimos usos que dele são feitos (VON SPERLING, 2005). Sendo que o Rio do Campo é um importante recurso hídrico do município de Campo Mourão, pois é responsável pelo abastecimento de 80 % da população mourãoense (ALBUQUERQUE, 2008), é de imprescindível importância verificar a qualidade da água deste manancial superficial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a contaminação aquática da região da região centro-oeste do Paraná, com base em testes de genotoxicidade e mutagenicidade/citotoxicidade usando como bioindicador o peixe *Astyanax aff. paranae* (Teleostei, Characidae).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Avaliar a taxa de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *A. aff. paranae* em corpos hídricos com diferentes níveis de contaminação;
2. Verificar através do ensaio cometa se há diferentes taxas de fragmentação no DNA entre trechos de rios com diferentes níveis de poluição;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A poluição das águas doces superficiais é um dos grandes problemas ambientais atuais. Sua contaminação é muito fácil, mas o mesmo não se pode dizer de sua descontaminação, a qual muitas vezes é dispendiosa e em alguns casos impossível de ser executada (TOWSEND et al., 2006).

Esta predição pode ser verificada em análises de pesticidas e metais pesados em água que são mensurados a partir de cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou espectrofotometria de massa (MS). Estes métodos de análise exigem mão de obra especializada e apresentam alto custo operacional, o que torna inviável sua aplicação em larga escala (ARIAS et al., 2007), além de permitirem apenas um conhecimento instantâneo, portanto limitado, das condições da água no momento em que são feitas as medições. (LOBO et al., 2002).

Neste sentido, o uso de bioindicadores e biomarcadores pode consumir menor tempo de análise, requerer menor esforço humano e ser mais econômico (JONSSON et al., 2005). Além disso, apresentam a vantagem de oferecer informações de efeito ambiental prolongados, isto é, são capazes de refletir estados não mais existentes no momento da verificação, porém, originados a partir do processo ocorridos anteriormente na comunidade (LOBO et al., 2002).

Para que os organismos sejam bons bioindicadores devem-se considerar critérios tais como: a) relevância ecológica, b) suscetibilidade dos organismos, e c) caracterização preliminar dos efeitos aos organismos expostos. Ainda é desejável a possibilidade de sua criação e manutenção em condições de experimentação, de modo a se obter dados de toxicidade para o estabelecimento de limiares de concentração quanto à alteração do parâmetro estudado (JONSSON et al., 2005).

Biomarcadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio no status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, comportamentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo (ARIAS et al., 2007).

Ao nível celular, pode ser utilizado o teste do micronúcleo como biomarcador de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que associações positivas entre exposição a misturas de pesticidas e a presença de micronúcleos tem sido observada em diversos estudos realizados com estes compostos. Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al., 2001).

Os micronúcleos podem aparecer por várias causas, entre elas por falha mitótica, tanto de fragmentos acêntricos de cromossomos, gerados por ruptura (clastogenicidade), quanto de cromossomos completos (aneuploidia), como consequência, geralmente, de enfermidades genéticas (ARIAS et al., 2007).

A avaliação das alterações morfológicas nucleares e os micronúcleos são ensaios que têm sido bastante utilizados para investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986).

As alterações morfológicas nucleares têm sido interpretadas como lesões nucleares análogas aos micronúcleos. Os resultados de Ayllon & Garcia-Vazquez (2000) mostraram que essas anomalias são induzidas por compostos genotóxicos bem-conhecidos, mesmo quando os micronúcleos não foram induzidos. Além disso, elas geralmente ocorrem em frequências maiores que os micronúcleos, o que possibilita a aplicação de testes estatísticos.

Outro biomarcador muito utilizado para demonstrar danos induzidos por contaminantes é o Ensaio Cometa (BELPAEME et al., 1998). Esse ensaio investiga danos no DNA (simples, dupla-fita) em nível celular individual, através da medição da migração em gel do material genético de células, depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988). O nome '*Cometa*' refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA, deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL et al., 2001).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA pesquisado tenha dano, serão formadas quebras no material genético e/ou consequentes fragmentos de diversos tamanhos, de modo que na eletroforese, os

fragmentos menores migram mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores. Ocorrendo um dano intenso no material celular, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, originando a figura típica de um cometa (OLIVE et al., 1990).

O Ensaio Cometa pode ser uma ferramenta interessante para monitoramentos de genotoxicidade de exposições e para investigar os impactos na integridade do dano no DNA, em espécies de interesse ambiental. Nesse sentido, três principais vantagens foram identificadas: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras, (iii) o ensaio é rápido, sensível e relativamente barato (BELPAEME et al., 1998).

O Ensaio Cometa é habitualmente realizado com eritrócitos, pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento celular – por já estarem em meio líquido, são facilmente diluídas em soro bovino fetal (meio de cultivo celular). Porém outros tecidos também podem ser utilizados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes tecido-específicos (BELPAEME et al., 1998).

De acordo com as informações supradescritas, verifica-se que os testes das aberrações nucleares, bem como o Ensaio Cometa em eritrócitos de peixes são técnicas amplamente utilizadas e que permitem interpretar a contaminação ambiental. Desta forma, este estudo fez uso destas técnicas em *Astyanax aff. paranae* para avaliar possíveis indícios de contaminação em mananciais superficiais com diferentes níveis de interferência antrópica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIE ESTUDADA

A espécie bioindicadora escolhida foi o lambari *Astyanax aff. paranae* Eigenmann, 1914, e sua escolha deu-se, principalmente, pela sua elevada frequência nos rios da região, fornecendo um bom número amostral, sua facilidade de manuseio, além do seu potencial bioindicador.

Astyanax aff. paranae é considerada uma espécie comum na bacia do alto rio Paraná (GARUTTI & BRITSKI, 2000), sendo registrada com ocorrência abundante na micro-bacia do rio Mourão (LUIZ et al., 2003). *A. aff. paranae* caracteriza-se como uma espécie de vida de ciclo curto (BARBIERI, 1992), com hábito alimentar predominantemente onívora (FERREIRA et al. 2004). A maioria das capturas desta espécie ocorre em áreas de águas correntes entre remansos, o que evidencia a importância de *A. aff. paranae* nesses ambientes (VEREGUE et al., 2003) (Figura 1).



Figura 1 - Exemplar de *Astyanax aff. paranae* coletado no rio do Campo. Nota: barra=1cm.

4.2 ÁREA DE ESTUDO

Foram escolhidos três pontos de amostragem em trechos de rios com diferentes níveis de contaminação (figura 2). O ponto 1 localizou-se no Rio do Campo, a montante da cidade de Campo Mourão, região com influência apenas da agricultura (Localização: 24° 4'56.37"S/ 52°26'31.05"O). O ponto 2 situou-se no

mesmo rio, a jusante do referido município, sendo influenciado pela área agrícola a montante e, principalmente, pelos despejos de efluentes urbanos, como por exemplo os provenientes da estação de tratamento de esgoto municipal (ETE - Rio do Campo) (Localização: 23°59'44.09"S/ 52°20'23.34"O). Aproveitando-se desta situação, a coleta dos animais no ponto 2 ocorreu a poucos metros da liberação do efluente da referida ETE.

Vale a pena ressaltar que os dois pontos amostrais do Rio do Campo possuem uma barreira física que os separa. Trata-se de um represamento artificial para formação do lago no Parque Municipal Joaquim Teodoro de Oliveira, que impede a migração dos indivíduos entre os pontos e, desta forma, confere independência as amostragens.

O município de Campo Mourão possui uma economia essencialmente agrícola, neste se situa a maior cooperativa agropecuária do Brasil e a terceira maior do mundo. Destaca-se a cidade pela expressiva produção de grãos, especialmente milho e soja, propiciada pelo relevo e solos profundos, que favorecem o desenvolvimento da agricultura mecanizada na região. A agricultura ocupa 83,58% da área do município. Essa condição favorável para o uso intensivo do solo tem levado, no entanto, ao descuido quanto às práticas voltadas à conservação do solo. Os métodos inadequados que favorecem a erosão que ainda são comuns na região (SEMA CAMPO MOURÃO, 2008).

O ponto 3 situou-se no córrego Concórdia da Reserva Biológica das Perobas (REBIO das Perobas), municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte, região centro-noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil. Assumiu-se este ponto amostral como controle negativo do presente trabalho por ser um local com menor nível de antropização e por sua nascente estar próxima a uma reserva biológica, unidade de conservação com alto nível de preservação. Poucos metros após a formação do córrego Concórdia, o mesmo adentra a zona de amortecimento da REBIO das Perobas e, posteriormente, passa marginalmente na porção florestada da reserva.

A Reserva Biológica das Perobas é uma unidade de conservação federal com 8.716 hectares (figura 2), localizada a 23°52'52"S, 52°44'08"W e a 600 m de altitude, A área é caracterizada pelo contato entre a Floresta Estacional Semidecidual Submontana, onde predominam perobas, cedros e palmitos, e a Floresta Ombrófila Mista, distinguindo-se pela ocorrência do pinheiro-do-paraná (SILVA et al., 2011).

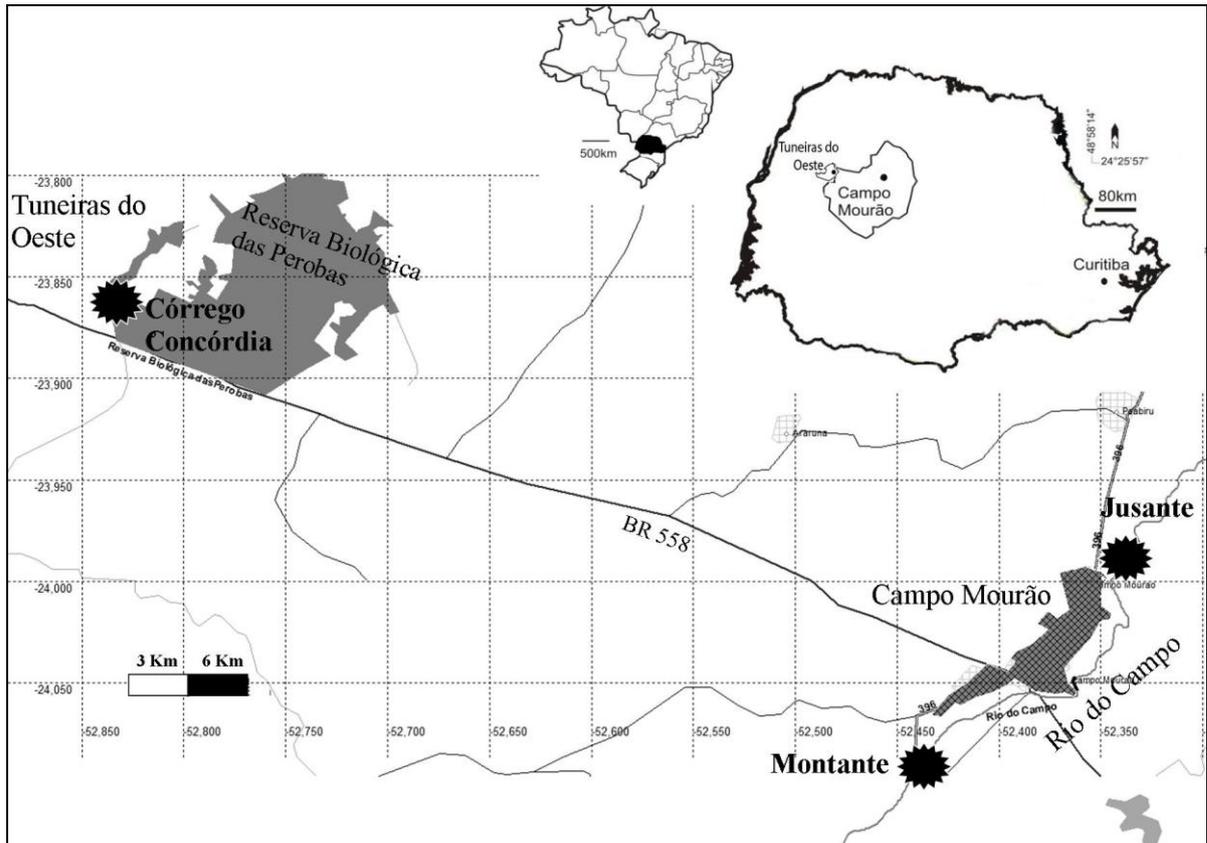


Figura 2 - Área de estudo com a localização dos pontos amostrais. Dois pontos foram alocados no rio do Campo (jusante e montante do município de Campo Mourão-PR) e outro no córrego Concórdia (na REBIO das Perobas – municípios de Tuneiras do Oeste e Cianorte-PR).

4.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL

O procedimento amostral adotado no presente trabalho idealizou a coleta de aproximadamente 20 indivíduos de *Astyanax aff. paranae* por ponto amostral e estação do ano, totalizando 120 indivíduos..

Foram realizadas duas coletas, uma no inverno (agosto de 2011) e outra no verão (dezembro de 2011), sendo em ambas amostrados os três pontos de coleta escolhidos neste trabalho.

Nos pontos no rio do Campo, a jusante e a montante do município de Campo Mourão, utilizou-se redes de espera (1,2 m x 5 m e malha de 1,5 cm ente nós opostos) como método de coleta. Estas redes foram expostas paralelamente às margens do rio por um período de tempo variável, de acordo com o número de indivíduos capturados, sendo vistoriadas de hora em hora.

No córrego Concórdia utilizou-se da técnica do peneiramento (0,60 X 1,2 m e malha de 0,30 cm) como metodologia de captura dos indivíduos. As coletas foram realizadas com peneiras, uma vez que o local é um ponto muito próximo a nascente do rio, portanto a quantidade de nutrientes bem como a quantidade de exemplares existentes no local é menor (Figura 3).



Figura 3 - Imagem do córrego Concórdia, um riacho oligotrófico onde foram realizadas coletas na REBIO das Perobas, Tuneiras do Oeste e Cianorte-PR.

Os indivíduos capturados com ambos os métodos de coleta foram acomodados em recipiente de poliestireno, de 80 L, com aerador, buscando mantê-los vivos. Posteriormente, estes indivíduos foram transportados até o laboratório de Ecologia da UTFPR, câmpus Campo Mourão, onde ocorreram os procedimentos de triagem.

Em laboratório, os indivíduos foram identificados e enumerados de acordo com o ponto amostral e a estação do ano. Em seguida, os exemplares foram anestesiados com cloridrato de benzocaína a 20%, evitando-se seu sofrimento, para a tomada dos dados morfométricos e para coleta de sangue.

Os dados morfométricos foram mensurados para cada indivíduo quanto ao comprimento total (Ct) e padrão (Cp), em centímetros, e peso total (Pt), em gramas. Para a coleta de sangue, fez-se uma punção cardíaca, em cada indivíduo, com o auxílio de uma seringa de insulina previamente heparinizada para evitar a coagulação do sangue. Após a retirada do sangue, uma subamostra foi destinada ao teste das aberrações nucleares e outra subamostra para o protocolo do Ensaio Cometa.

Para a realização do teste das aberrações nucleares em eritrócitos de peixes (figura 4) foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975), que consiste, resumidamente, na realização de um esfregaço de sangue de cada indivíduo em uma lâmina para posterior coloração com Giemsa a 10% (Anexo I – metodologia completa). Após a coloração, fez-se a contagem de 1000 células de sangue por lâmina, buscando-se visualizar aberrações morfológicas nucleares nos eritrócitos dos indivíduos, como por exemplo, alterações em bolha, lobado, vacuolado, entalhado e micronucleado (figura 5).

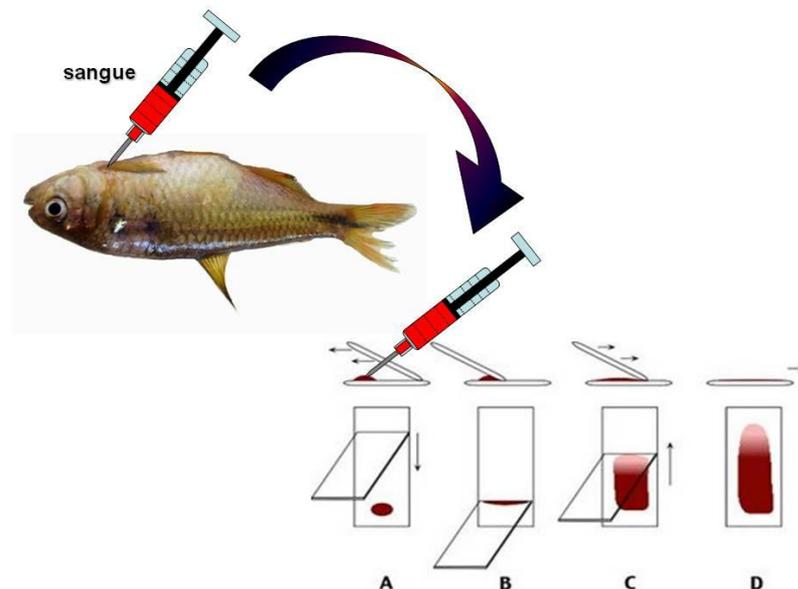


Figura 4 - Esquema para confecção de lâminas do teste do micronúcleo písceo e aberrações morfológicas nucleares. Realizou-se uma punção cardíaca, pingou-se uma gota de sangue em uma lâmina (A), com o auxílio de uma lamínula fez-se o esfregaço (B, C e D).

a) *Blebbled* (em bolha): núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina.

b) *Lobed* (Lobado): núcleos com evaginações mais largas

c) *Vacuolated* (Vacuolado): núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior.

d) *Notched* (Entalhado): núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma

e) *Binucleated* (Binucleada): apresenta dois núcleos

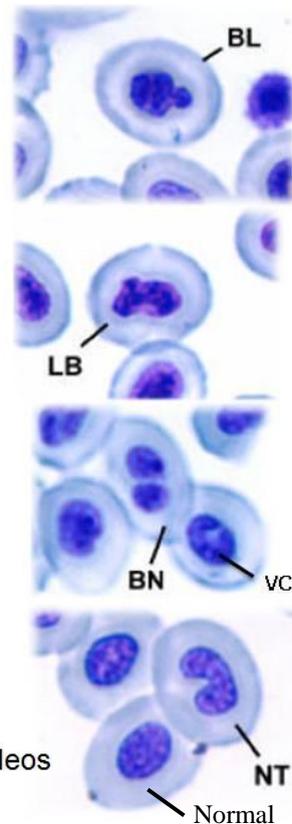


Figura 5 - Tipos de alterações registradas no teste das aberrações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes. Fonte: Jiraungkoorskul; Sahaphong (2007).

Para a realização do Ensaio Cometa (figura 6) (Anexo II – Protocolo completo do Ensaio Cometa), seguiu-se resumidamente a seguinte metodologia: a) o sangue anteriormente retirado foi homogeneizado em soro bovino fetal, dentro de um microtubo de centrifugação (tipo *ependorf*); b) com auxílio de uma micropipeta foram retirados 15 μ l da primeira mistura para posterior diluição em 120 μ l de agarose de baixo ponto de fusão (Anexo III – protocolo completo de preparo); c) em seguida, esta mistura foi repassada para lâminas cobertas com agarose normal (Anexo IV – protocolo completo de preparo); d) posteriormente, as lâminas foram armazenadas em geladeira, dentro em uma solução de lise, por dois meses, para quebrar a membrana citoplasmática das células e expor seus respectivos DNAs; e) após a lise das membranas e exposição do DNA foi realizada a corrida eletroforética, visando o deslocamento do DNA; f) depois da realização da eletroforese, da neutralização e da fixação, as lâminas foram coradas com 15 μ de brometo de etídeo 0,02g/ml (diluído em água).

Após a preparação e coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência para contagem de 100 células. Nesta contagem, avaliaram-se os tipos de dano e a sua frequência de aparecimento (figura 7).

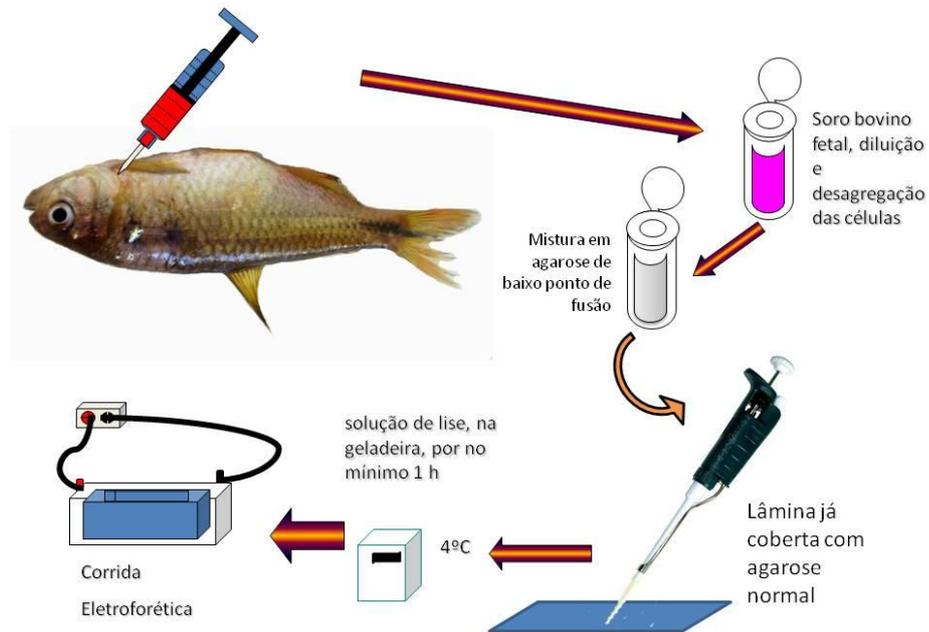


Figura 6 - Esquemática dos Procedimentos adotados para o Ensaio Cometa.

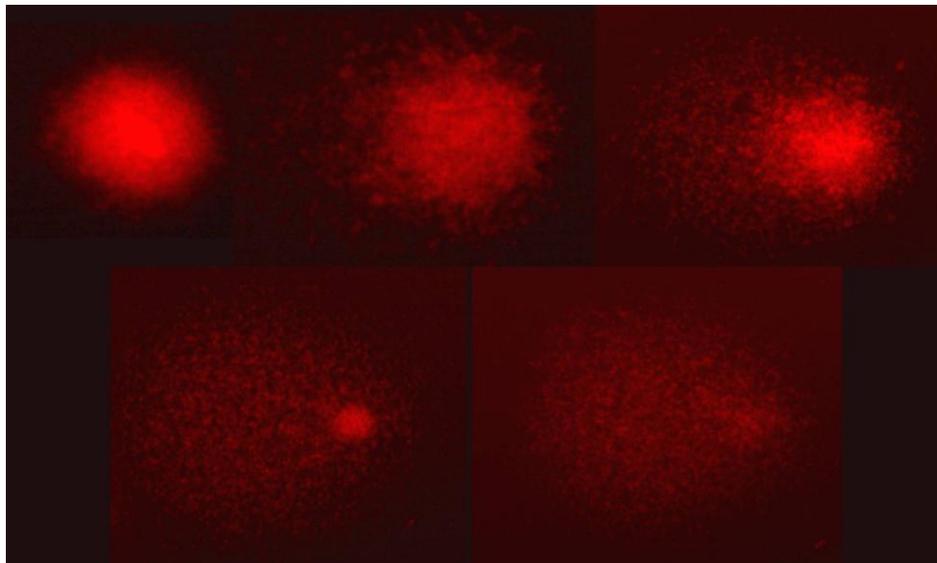


Figura 7 - Classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA, e suas classes de dano: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano médio) 3 (dano extenso), 4 (dano máximo, apoptose).

4.4 ANÁLISES DE DADOS

A partir do planilhamento dos dados foram realizadas análises estatísticas para checagem dos pressupostos de normalidade residual e homogeneidade das variâncias utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Após a checagem dos pressupostos, foi aplicada a análise de variância paramétrica (ANOVA) e a *posteriori* foi utilizado o teste das mínimas diferenças significativas de Fisher (LSD). Estas análises possibilitaram a comparação entre os tratamentos: ponto controle X ponto Montante X ponto Jusante.

Pelo fato do ponto controle não ter respondido conforme esperado e para evitar mascarar os resultados, não foi possível utilizar ANOVA bifatorial. Desta forma, optou-se em utilizar uma ANOVA simples, considerando o ponto e a estação em questão como uma única variável.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DO MICRONÚCLEO PISCEO

Variações consistentes na forma normal elíptica do núcleo dos eritrócitos foram aparentes no sangue dos peixes analisados durante este estudo. Algumas dessas alterações são mostradas na figura 8. Entre as técnicas citogenéticas atuais, as anormalidades nucleares e os micronúcleos são considerados bons indicadores de citotoxicidade e toxicologia, respectivamente (LOBO *et al.*, 2002).

Ayllón & Garcia-Vazquez (2000) mostraram que as alterações morfológicas nucleares são induzidas por compostos genotóxicos bem conhecidos, mesmo quando os micronúcleos não são formados. Acredita-se que estas anomalias nucleares aconteçam devido a problemas com a *lâmina*, uma proteína do núcleo, pois é esta estrutura que confere o formato oval regular e a estabilidade nuclear (ALBERTS *et al.*, 1997).

O teste do micronúcleo é um biomarcador fácil, sensível e responsivo para avaliar alterações estruturais, perda de DNA e anormalidades cromossômicas numéricas (HEDDLE *et al.*, 1991). Este biomarcador em eritrócitos periféricos fornece uma abordagem viável para monitorar os efeitos de agentes genotóxicos em peixes (BOLOGNESI *et al.*, 2006).

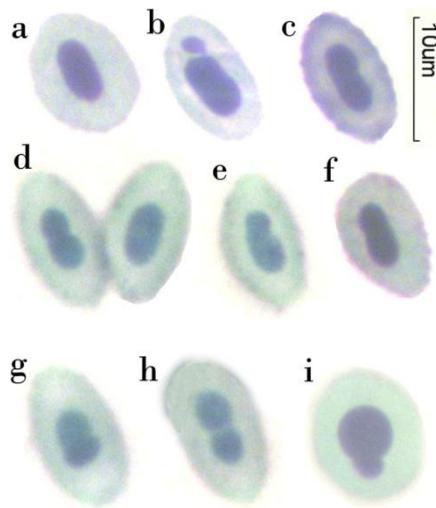


Figura 8 - Fotos de alterações morfológicas nucleares. a: núcleo normal; b: blebbed (não é micronúcleo, pois ainda apresenta uma ponte de cromatina ligando ao núcleo principal); c-f: notched; g: lobed; h: binucleada; i: Blebbed.

Através da ANOVA foram verificadas diferenças significativas na taxa de dano nuclear em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae*, considerando os diferentes locais e as estações de ano ($F_{(5, 113)} = 76,3$; $p < 0,05$). Após, para verificar as diferenças entre os tratamentos adotados neste trabalho, foi utilizado o teste das mínimas diferenças significativas de Fisher (LSD), sendo seus resultados expostos na tabela 1 e na figura 9. Através do referido teste, pôde-se constatar os seguintes resultados: 1- os exemplares da REBIO, durante a estação do verão, apresentaram as maiores taxas de alterações nucleares; 2- os indivíduos dos pontos Jusante, no inverno e no verão, e Montante, no verão, apresentaram taxas de danos nucleares intermediárias; 3- os peixes capturados nos pontos Montante e REBIO, no inverno, foram os que tiveram as menores taxas de alterações nucleares em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae*.

Tabela 1- Teste LSD realizados a partir das taxas de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae* coletados no verão e no inverno. Entre parênteses: valores médios de cada tratamento (T). Em vermelho, valores significativos ($p < 0,05$).

T	Local*Estação	1 (6,3)	2 (12,2)	3 (5,7)	4 (10,6)	5 (10,0)	6 (32,8)
1	Montante.Inverno						
2	Jusante.Inverno	0,000019					
3	REBIO.Inverno	0,693977	0,000012				
4	Montante.Verão	0,001545	0,261649	0,000829			
5	Jusante.Verão	0,005742	0,111757	0,003021	0,650451		
6	REBIO.Verão	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

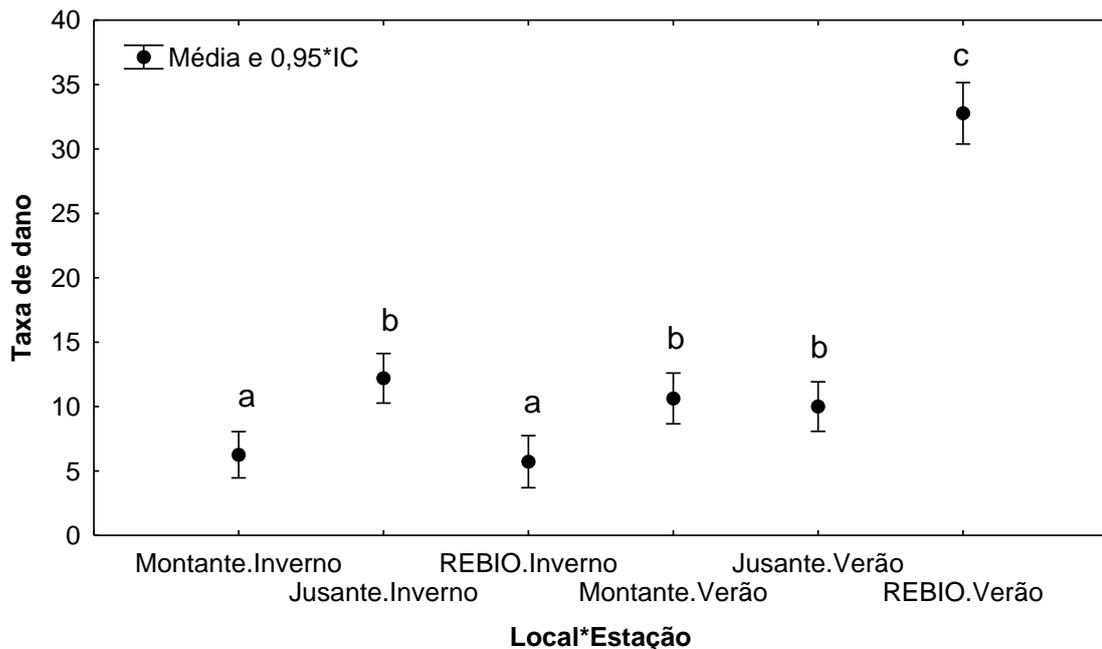


Figura 9 - Média e intervalo de confiança da taxa de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae*, considerando-se conjuntamente os pontos amostrais e as estações de ano. a, b, c = representação do resultado do teste das mínimas diferenças significativa de Fisher.

A partir dos resultados obtidos, foi possível constatar que o córrego Concórdia sofre impacto de contaminantes, uma vez que no verão foram observadas elevadas taxas de alterações nucleares. Este resultado pode ser explicado pelo fato do córrego Concórdia nascer fora do perímetro da REBIO das Perobas. Ainda, o

referido córrego passa apenas marginalmente na reserva, na sua zona de amortecimento. Antes de chegar à reserva biológica das Perobas, observa-se que áreas de agricultura intensiva e pecuária ocorrem em suas margens, somado-se a escassa mata ciliar no seu entorno (ICMBio da REBIO das Perobas, com pessoal).

A vegetação existente nas margens dos mananciais superficiais pode ser considerada como um mecanismo de proteção dos recursos hídricos, por ser uma área de proteção permanente devidamente regulamentada pelo Código Florestal Brasileiro (Lei nº 4.771 de 15 de setembro de 1965). O referido código considera como área de preservação permanente as florestas e demais formas de vegetação naturais, situadas ao longo de rios ou de qualquer curso d'água. Se o curso hídrico possuir menos de 10 metros de largura, como no caso do córrego Concórdia, a faixa de vegetação protegida deve ser de, no mínimo, 30 metros. No caso de nascentes, como também observado no ponto controle deste estudo, a área de proteção permanente deve ser ainda maior, abrangendo um entorno de 50 metros (MEDAUAR 2004).

Corroborando com as informações supradescritas, a WWF Brasil (2012) relata que, dentre as inúmeras funções ecológicas da vegetação ciliar e outras áreas de preservação permanente, estão a de diminuir os problemas de erosão do solo e manter a qualidade das águas dos rios e lagos. Provavelmente, o carreamento de poluentes para dentro do córrego Concórdia é facilitado pelas atividades agrícolas (com a aplicação de defensivos agrícolas), pela pecuária e pela escassez da vegetação ciliar no curso de água, antes do mesmo chegar a REBIO das Perobas. Ainda, a elevada pluviosidade do verão associada com o solo composto de arenito Caiuá, que apresenta suscetibilidade a erosão devido a baixa coesão, devem ter contribuído como um agente facilitador da contaminação do curso hídrico e, conseqüentemente, de sua fauna.

Segundo a Lei Federal 9985/00 uma Reserva Biológica 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 (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA DO BRASIL, LEI No 9.985, 18 DE JULHO DE 2000). Tendo em vista a lei anteriormente citada, o código Florestal Brasileiro e a importância da vegetação ciliar, sugere-se que a zona

de amortecimento seja estendida e incorpore a nascente do córrego Concórdia, garantindo a devida proteção à fauna local.

Os menores valores das taxas de alterações nucleares encontradas nos peixes dos pontos Montante e REBIO, no inverno, se deve provavelmente pelo fato desta estação representar o período entre safras da agricultura e, portanto, subentende-se que a quantidade de defensivos agrícolas utilizados é menor, e ainda neste período a intensidade pluviométrica é menor que a encontrada no verão. Este cenário deve favorecer os indivíduos que, provavelmente, passam por uma reparação dos danos, diminuindo-os assintomaticamente (ALBERTS et al. 2010).

Os pontos Jusante, inverno e verão, e Montante, verão, obtiveram taxas de dano consideradas “intermediárias” em relação aos outros pontos. No ponto Montante, verão, provavelmente ocorre um maior uso de defensivos agrícolas por se tratar do período de safras, sendo este também um período mais chuvoso. Com isso, sugere-se que há um maior carreamento de poluentes para dentro do rio e, conseqüentemente, há uma maior taxa de danos comparativamente ao inverno. Porém, a Montante se encontra próxima a nascente do rio, fazendo com que os indivíduos tenham um tempo de exposição aos possíveis contaminantes ali existente reduzido. Já o ponto Jusante, independentemente da estação do ano, possui influência direta, durante todas as estações do ano, da ETE de Campo Mourão. Este fato, provavelmente, influencia a ocorrência dos micronúcleos e das demais alterações.

A ETE do rio do Campo, em Campo Mourão, realiza o tratamento preliminar, para remoção de sólidos grosseiros, primário, para remoção de sólidos sedimentáveis, e secundário, que visa reduzir a DBO. O método utilizado no tratamento secundário em Campo Mourão, é por reatores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), que se constituem na principal tendência atual de tratamento de esgotos no Brasil (VON SPERLLING, 2005). O mesmo autor relata que este sistema apresenta uma eficiência de remoção da DBO, em torno de 70%.

Após o efluente passar pelo reator UASB, é destinado para lagoas facultativas para sua estabilização. O período de estabilização da matéria orgânica neste processo é, usualmente, superior a 20 dias, porém estas não realizam a remoção de patógenos e de poluentes específicos (compostos usualmente tóxicos ou não biodegradáveis) ou ainda, a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário (VON SPERLLING, 2005).

Com esta descrição realizada acima do tipo de tratamento realizado na ETE de Campo Mourão, verifica-se a não remoção de micropoluentes e isto sustenta argumentação de que os organismos destes locais estão sujeitos a influência destas substâncias tóxicas.

O trabalho realizado por Machado et al. (2011), na zona urbana deste mesmo rio e com peixes do mesmo gênero (*Astyanax altiparanae*), também indicou a presença de substâncias potencialmente mutagênicas nas águas do rio do Campo. O referido trabalho mostrou que a taxa de dano nuclear encontrada nos eritrócitos dos peixes do rio do Campo foi significativamente maior que a taxa de dano nuclear observada em indivíduos de laboratório, que tinham contato apenas com águas não contaminadas.

Estes resultados, somado aos encontrados neste trabalho, mostram que as águas do rio do Campo estão sofrendo algum tipo de contaminação, seja por resíduos de produtos oriundos da agricultura e pecuária ou por meio de efluentes urbanos da cidade de Campo Mourão. Com isso, sugere-se que estudos minuciosos da química da água sejam realizados para detecção das substâncias potencialmente tóxicas e, desta forma, auxiliar as autoridades na promulgação de leis que regulamentem e inibam as atividades poluidoras.

No mesmo sentido, Al-Sabti; Metcalfe (1995) descreveram que descargas industriais e urbanas são responsáveis pela maior concentração de substâncias tóxicas nos ambientes aquáticos, embora em muitos países, atividades regulatórias começam a impor limites a esses despejos de efluentes tóxicos nos suprimentos de água das populações humanas.

Muitos trabalhos de campo como este, têm avaliado eficientemente o nível de contaminação e o potencial toxicológico em ambientes aquáticos, através de testes como o do Micronúcleo Píscico (AMADO et al., 2006; BOMBAIL et al., 2001; HOSE et al., 1987; MINISSI et al., 1996). Tais trabalhos têm verificado que os peixes podem agir como “sentinelas” para indicar o potencial à exposição de populações humanas a substâncias tóxicas em corpos hídricos de abastecimento público (AL-SABTI, ; METCALFE, 1995).

5.2 ENSAIO COMETA

Através da ANOVA verificou-se que houve diferenças significativas na taxa de fragmentação do DNA entre os pontos amostrais e estações ($F_{(5, 97)}=3,6589$, $p<0,05$). O teste das mínimas diferenças significativas de Fisher indicou que a REBIO, no verão, apresentou as menores taxas de fragmentação de DNA. Na REBIO, no inverno, também foram constatados baixos valores de fragmentação do DNA. Os maiores valores de fragmentação do DNA foram observados nos espécimes coletados no ponto à Jusante, durante o verão (tabela 2 e figura 10).

Tabela 2- Teste das mínimas diferenças significativas de Fisher realizados com os dados do Ensaio Cometa de *Astyanax aff. paranae* coletados no verão e no inverno. Entre parênteses, valores médios de cada tratamento (T); Em vermelho, valores significativos ($p < 0,05$).

T	Local*Estação	1 (147,8)	2 (139,2)	3 (119,7)	4 (149,9)	5 (172,1)	6 (100,8)
1	Montante.Inverno						
2	Jusante.Inverno	0.581133					
3	REBIO.Inverno	0.074746	0.220884				
4	Montante.Verão	0.894410	0.495010	0.056182			
5	Jusante.Verão	0.201744	0.087147	0.007083	0.242212		
6	REBIO.Verão	0.005696	0.024623	0.263168	0.003973	0.000530	

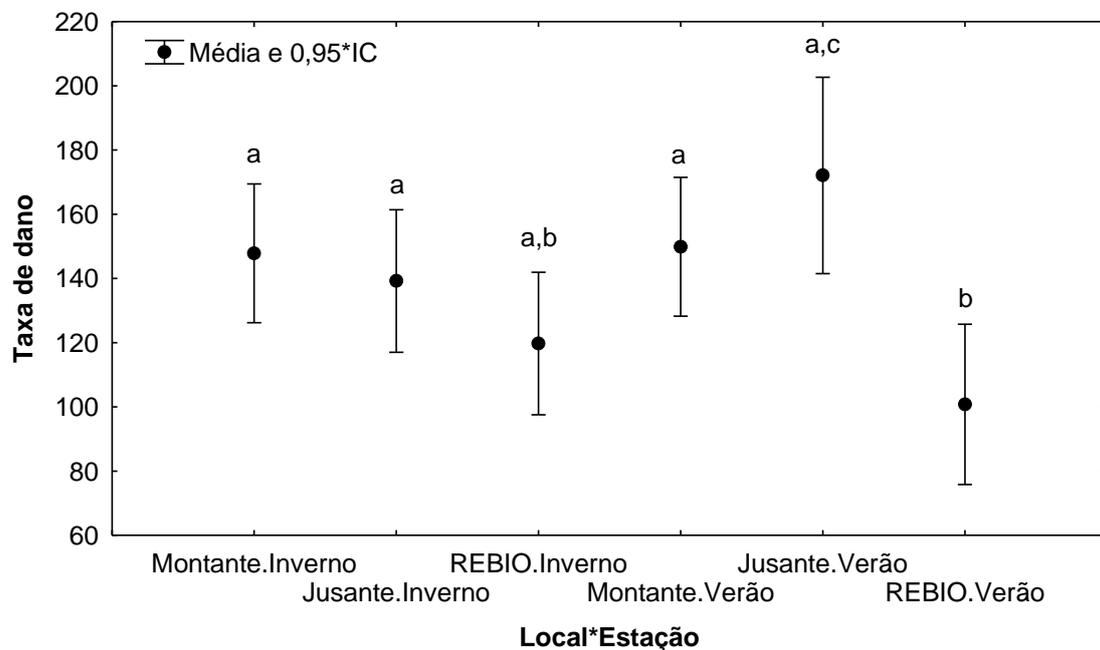


Figura 10 - Média e intervalo de confiança da taxa de fragmentação de DNA em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae*, considerando-se conjuntamente os pontos amostrais e as estações de ano. a, b, c = representação do resultado do teste das mínimas diferenças significativa de Fisher.

Os baixos níveis de fragmentação do DNA (genotoxicidade) na REBIO, inverno e verão, associadas às elevadas taxas de aberrações nucleares na REBIO no verão, sugerem que os indivíduos da reserva estão sofrendo interferência de substâncias com efeito citotóxico, mas não genotóxico. Como dito anteriormente, provavelmente estas substâncias causam uma desestruturação na *lâmina nuclear* (uma estrutura formada de filamentos intermediários, que confere estabilidade mecânica ao envoltório nuclear), e isso promove uma alteração na forma do núcleo, mas sem afetar a integridade do DNA em si.

Na jusante se encontra a ETE que devido à falta de um tratamento terciário adequado, lança um número maior de substâncias potencialmente tóxicas, como já visto anteriormente, e isso provavelmente explica os maiores níveis de fragmentação do DNA, ou seja, efeitos genotóxicos, e também valores intermediários de alterações na morfologia do núcleo, efeitos citotóxicos.

Nos pontos situados a montante (inverno e verão) e a jusante (inverno) foram encontradas taxas de dano ao DNA medianas. A proximidade do ponto a Montante com a nascente do rio do Campo (maior integridade ambiental) e a menor influência e acúmulo de substâncias potencialmente poluidoras, quando comparado ao ponto a jusante, são as principais explicações para os resultados obtidos neste local. No entanto, mesmo diante deste cenário, os peixes do ponto a Montante podem estar sujeitos a contaminação ambiental, provavelmente, devido aos agroquímicos utilizados na agricultura intensiva de seu entorno.

Os resultados encontrados por este trabalho, além de constituírem novos dados sobre a avaliação da qualidade ambiental no Rio do Campo e no córrego Concórdia, ainda 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.

6 CONCLUSÃO

A utilização de peixes como bioindicadores para realizar um monitoramento ambiental se mostrou um método alternativo aos métodos abióticos comumente utilizados e revelou-se muito eficiente e responsivo, além de ser um método menos oneroso, quando comparado a análises físicas e químicas da água. Para aumentar a eficiência da constatação de alterações no meio, sugere-se o uso mais biomarcadores em um maior número de tecidos alvos, assim obtendo maior número de informações que podem ser cruzadas.

A utilização de bioindicadores e biomarcadores no monitoramento ambiental mostrou-se eficiente para a comparação de trechos de rios com diferentes níveis de contaminação, porém algumas respostas divergentes demonstraram a complexidade e a dificuldade dos estudos de campo, na área de ecotoxicologia. Para aumentar a eficiência da constatação de alterações no meio, sugere-se: 1- o uso de uma gama maior de biomarcadores; 2- um maior número de moléculas, células e/ou tecidos alvos; 3- o acoplamento de análises físicas e químicas da água. Estas informações quando cruzadas podem aprimorar o conhecimento sobre a toxicologia ambiental.

A constatação de elevados níveis de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae* (sem registro de micronúcleos) e baixos níveis de fragmentação do DNA, sugerem que a REBIO das Perobas está sujeita a contaminação ambiental, sendo as substâncias xenobióticas desta área muito mais citotóxicas do que genotóxicas. Já no ponto a Jusante, os maiores níveis de fragmentação de DNA associados com relevantes níveis de aberrações nucleares indicam um maior número de substâncias tóxicas, afetando tanto as células (citotoxicidade) quanto o material genético (genotoxicidade). Estas verificações sugerem que as substâncias xenobióticas que agem sobre os organismos nos diferentes locais possuem diferentes mecanismos de ação.

A proximidade da nascente do rio do Campo e o não recebimento de efluentes urbanos não foram suficientes para livrar os exemplares coletados no ponto a Montante dos efeitos de agentes antrópicos, visto que valores intermediários de danos foram detectados. Isso sugere que as áreas agrícolas do entorno, com uso intensivo de agroquímicos, estão influenciando negativamente a fauna aquática deste local. Vale ressaltar que alguns quilômetros abaixo deste ponto encontra-se a Estação de Tratamento de Água de Campo Mourão, a qual utiliza esta água para o

abastecimento público, tratamento este que não remove por completo micropoluentes que de alguma forma podem afetar a população deste município, da mesma forma que afeta nosso organismo bioindicador.

Para finalizar, mesmo a REBIO das Perobas sendo uma área de proteção permanente, a mesma está sujeita a entrada de substâncias potencialmente genotóxicas, fato que deve soar como um alerta para as autoridades para melhorar as condições da sua zona de amortecimento instituída por lei.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERT, Keith; WATSON, James D. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. p. 1294

ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERT, Keith; WATSON, James D. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Artmed, 2010.

ALBUQUERQUE, Andrei R. **Situação da floresta ripária na microbacia hidrográfica do rio do campo (trecho Campo Mourão / Piquirivaí) e sua interferência na qualidade da água**. Faculdade Integrado. Campo Mourão, 2008.

AL-SABTI, Khalid. **Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio L.*)**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 85, p.5-9, 1986.

AL-SABTI, Khalid; METCALFE, Chris D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water**. Mutation Research, v.343, p. 121-135, 1995.

ALVES, Sergio R. **Avaliação dos resíduos de pesticidas organofosforados e carbamatos por metodologia enzimática no córrego de São Lourenço, Nova Friburgo/RJ, Brasil**. Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2000.

AMADO, Lílian L.; ROSA, Carlos E.; LEITE, Alice M.; MORAES, Loraine; PIRES, Wagner V.; PINHO, Grasiela L. L.; MARTINS, Camila M. G.; ROBALDO, Ricardo B.; NERY, Luis E. M.; MONSERRAT, José M.; BIANCHINI, Adalto; MARTINEZ, Pablo E.; GERACITANO, Laura A. **Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects**. Marine Pollution Bulletin, v. 52, n.2, p.199-206, 2006.

AMORIM, Leiliane C. A. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

ARIAS, Ana R. L.; BUSS, Daniel F.; ALBUQUERQUE, Carla; INÁCIO, Alan F.; FREIRE, Marina M.; EGLER, Mariana; MUGNAI, Riccardo; BAPTISTA, Darcilio F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 12, n.1, p. 61-72, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232007000100011&script=sci_arttext>. Acesso em: 7 out. 2011.

AYLLON, Fernando; GARCIA-VAZQUEZ, Eva. **Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test.** Mutation Research, v.467, p. 177-186, 2000.

BARBIERI, Geraldo M. **Biologia de *Astyanax scabripinnis paranae* (Characiformes, Characidae) do ribeirão do Fazzari.** São Carlos. São Paulo. Revista Brasileira de Biologia, v.52, n.1, p. 589-596, 1992.

BELPAEME, Kathy; COOREMAN, Kris; KIRSCH-VOLDERS, Micheline. **Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish.** Mutation Research, v. 415, n. 3, p.167-184, 1998.

BOLOGNESI, Claudia; PERRONE, Emanuela; ROGGIERI, Paola; PAMPANIN, Daniela M.; SCIUTTO, Andrea. **Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions.** Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), v. 78 Suppl 1, p. S93-8, 2006.

BOMBAIL, Vincent; AW, Dennis.; GORDON, Emma.; BATTY, Jennifer. **Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland.** Chemosphere, v.44, p.383-392, 2001.

CARRASCO, Kenneth R.; TILBURY, Karen L.; MYERS, Mark S. **Assessment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Ottawa, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CESTARI, Marta M.; LEMOS, Pricila M. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, Ciro A.; COSTA, João R. M. A.; PELLETIER, Emilien; FERRARO, Marcos V. M.; MANTOVANI, Mário S.; FENOCCHIO, Alberto S. **Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations.** Genetics and Molecular Biology, v.27, n2, p.270–274, 2004.

FERRARO, Marcos V., FENOCCHIO, Alberto. S., MANTOVANI, Mário S., CESTARI, Marta M., RIBEIRO, Ciro A. O. **Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests.** Genetics and Molecular Biology, v.27, n1, p.103-107, 2004.

FERREIRA, Anderson. **Ecologia trófica de *Astyanax paranae* (OSTEICTHYES, CHARACIDAE) em córregos da bacia do rio Passa-Cinco, Estado de São Paulo.** Piracicaba. São Paulo. Dissertação de Mestrado. Escola superior de agricultura Luiz Queiroz, 2004.

GARUTTI, Valdener; BRITSKI Heraldo A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v.13, p. 65-88, 2000.

GHISI, Nédia. C.; RAMSDORF, Wanessa A.; FERRARO, Marcos V. M.; ALMEIDA Marina I. M.; RIBEIRO, Ciro A. O.; CESTARI, Marta M. **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.

GOKSØYR, Anders; ANDERSON, Tommy; BUHLER, Donald R.; STEGEMAN, John J; WILLIAMS, David E.; FORLIN, Lars. **Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone – inducible Cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat.** Fish Physiology, v.9, p. 1-13, 1991.

HEDDLE, John A. **A rapid in vivo test for chromosomal damage.** Mutation Research, v. 18, n. 2, p. 187-90, 1973.

HEDDLE, John A.; CIMINO, Michael C.; HAYASHI, Makoto; ROMAGNA, Felix; SHELBY, Michael D.; TUCKER, James D.; VANPARYS, Philippe; MACGREGOR, James T. **Micronuclei as an index of cytogenetic damage; past, present and future.** Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 18, n. 4, p. 277–291, 1991.

HOOFTMAN, Ria N.; de RAAT, Willem K. **Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate.** Mutation Research, Amsterdam, v. 104, p. 147–152, 1982.

HOSE, Jo E.; CROSS, Jeffrey N.; SMITH, Steven G.; DIEHL, Dario. **Elevated Circulating Erythrocyte Micronuclei in Fishes from Contaminated Sites off Southern California.** Marine Environmental Research, v. 22, p. 167-176, 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA, 2010, disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> acessado em 25 de maio 2012.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, **Plano de Manejo da Reserva Biológica das Perobas**, Brasília, 2012, 199p., disponível em:

<https://docs.google.com/file/d/0B96ON_XloXq3T1c0cW96bzBRay1VWF94dUEwZnRXQQ/edit?pli=1>, acessado em 25 de maio 2012.

JIRAUNGKOORSKUL, Wanee; SAHAPHONG, Somphong. **Efficacy of Ascorbic Acid Reducing Waterborne Copper Toxicity in Butterfish (*Poronotus striacanthus*)**. Journal of Biological Sciences, v.7, n.4, p. 620-625, 2007.

JONSSON, Cláudio M.; CASTRO, Vera L. **Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente**. Agência de informação Embrapa – Agricultura e Meio ambiente, Jaguariúna, out. 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Jonsson_Castro_biomarcadores/D-U4Vhi5C93K.pdf>. Acesso em: 15 set. 2011.

LACORTE Sílvia; BARCELO Damia. **Determination of organophosphorus pesticides and their transformation products in river water by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, 1995, A712: 103-112.

LOBO, Eduardo A.; CALLEGARO, Vera L.; BENDER, Elizangela P. **Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil**. Santa Cruz do Sul, EDUNISC, 2002.

LUIZ, Elaine A., GOMES, Luiz C., AGOSTINHO, Ângelo A.; BULLA, Cintia K. **Influência de processos locais e regionais nas assembléias de peixes em reservatórios do Estado do Paraná, Brasil**. Acta Scientiarum: Biological Sciences, v.25, n.1, p.107-114, 2003.

MACHADO, Eliane P.; GHISI, Nedia D. C.; OLIVEIRA, Elton C. D. **Avaliação da qualidade ambiental do Rio do Campo, Campo Mourão-PR, a partir da taxa de dano nuclear em eritrócitos de *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)**. II Simpósio Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. [S.l.: s.n.], 2011. p. 1-6.

MEDAUAR, Odete; TAPAI Giselle M. B. **BRASIL - Constituição federal, coletânea de legislação de direito ambiental. Lei Federal nº 4.771 de 15 de setembro de 1965**. 3. ed. São Paulo - SP. Revista dos Tribunais, 2004.

MINISSI, Sandra; CICCOTTI, Eleonora; RIZZONI, Marco. **Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater Mignone river**. Mutation Research, v. 367, p. 245-251, 1996.

OLIVE, Peggy L.; BANÁTH, Judit P.; DURAND, Ralph E. **Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" Assay**. Radiation Research, Oak Brook, v.122, p.86-94, 1990.

PAGOTTO, João P. A.; GREGÓRIO, Angelivia; PAZINATTO, Diogo V.; KLEIN, Diovane R.; TATARA, Elisa; SILVA, Grazielly C.; SILVA, João P.; BRAGA, Josiane S.; MACHADO, Lilian R. S.; FERREIRA, Maira R.; SANTOS, Paulo T. S.; COSTA, Rafael N.; HANISCH, Rogério F.; COSTA, Vagner F. **Limpeza do Rio do Campo em comemoração ao dia mundial da água**. CONGRESSO CIENTÍFICO DA REGIÃO CENTRO-OCIDENTAL DO PARANÁ III. Campo Mourão: [s.n.], 2009.

PAYNE, Jerry F.; FANCEY, Linda L.; RAHIMTULA, Anver D.; PORTER, Edward L. **Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, v. 79, p. 15-19, 1987.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA DO BRASIL, Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei No 9.985, 18 de julho de 2000, Regulamenta o art. 225, § 1o, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.htm>, acesso em 26 set. 2012.

SCHMID, Werner. **The micronucleus test.** Mutation research, v.31, n.1, p.9-15, 1975.

SEMA CAMPO MOURÃO, S. D. A. E. M. **Agenda 21 Local de Campo Mourão.** Campo Mourão: Município de Campo Mourão, 2008, 238p., disponível em: <<http://www.agenda21cm.org/>>, acesso dia 24 de maio de 2012.

SILVA, Josiane R. R.; FILHO, Henrique O. **Dípteros ectoparasitas (Insecta, Diptera) em morcegos (Chiroptera, Mammalia) na Reserva Biológica das Perobas Paraná, Brasil.** Iheringia, Série Zoologia, v. 101, n. 3, p. 220-224, 2011.

SINGH, Narendra P.; MCCOY, Michael T.; TICE, Raymond R.; SCHNEIDER, Edward L. **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.** Experimental Cell Research, v.175, p.184-191, 1988.

SPEIT, Günter; HARTMANN, Andreas. **The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** Henderson, D.S. (Ed.), Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols – Eukaryotic Systems, Human Press, Totowa v.113, p.203-211, 1999.

TOWNSEND, Colin R; BEGON, Michael; HARPER, John L. **Fundamentos em Ecologia.** 2 Ed. Porto Alegre:Artmed, 2006.

UIEDA, Virginia S. **Ocorrência e distribuição dos peixes em um riacho de água doce**. Revista Brasileira de Biologia, v. 44, p. 203-213, 1984.

Van GESTEL, Cornelis A. M.; Van BRUMMELEN, Timco C. **Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms**. Ecotoxicology, v. 5, p. 217 – 225, 1996.

VEREGUE, Ângela M. L.; ORSI, Mário L. 2003. **Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão das Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná**. Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v.20, n.1, p.97-105, 2003.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte MG: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

WHITFIELD, Alan K.; ELLIOTT, Michael. **Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future**. Journal of Fish Biology, v.61. p. 229-250, 2002.

ANEXOS

ANEXO I – METODOLOGIA COMPLETA PARA A REALIZACAO DO TESTE DO MICRONÚCLEO PISCEO

A técnica a ser aplicada consiste das seguintes etapas:

- a) Lâminas deverão ser bem limpas e identificadas.
- b) Ao coletar o sangue do animal anestesiado em benzocaína (solução alcoólica) se colocará uma gota de sangue deste na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, se fará um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina.
- d) A lâminas, após a secagem ao ar, serão fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.
- e) As lâminas serão coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 5 minutos e lavadas em água corrente.
- f) Serão analisadas 1000 células de cada animal, em teste cego. Este número de 1000 células foi padronizado. Somente serão consideradas na análise hemácias nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática intactas. São consideradas como micronúcleos as partículas que, em relação ao núcleo principal: não excederem 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo.

ANEXO II - METODOLOGIA COMPLETA PARA A REALIZACAO DO ENSAIO COMETA

As células serão homogeneizadas em soro bovino fetal, do qual será retirado uma amostra de 15 µL, que será misturada em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Essa suspensão será espalhada sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose normal, e será coberta com lamínula, levada a geladeira para endurecimento da agarose. Após este passo, retira-se a lamínula, e aloca as lâminas em uma solução de lise, para degradação das membranas celulares e nuclear, por no mínimo 24 horas a 4°C. Decorrido o tempo, as lâminas repousarão por 20 minutos em cuba de eletroforese, imersas em solução de NaOH e 200mM EDTA, pH>13. Executar-se-á a eletroforese por 30 minutos, a 300 mA e

25V. Segue-se a neutralização em solução de TRIS 0,4M, pH 7,5 e fixação em etanol por 10 minutos. Depois de secas, as lâminas serão coradas com 20 µL de brometo de Etídeo (diluído a 10 µL/mL), e serão analisadas em microscópio de epifluorescência.

Para cada peixe, serão analisados 100 nucleóides, 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) conforme mostra a figura 6. O score será calculado multiplicando o número de núcleos encontrado em dada classe pelo número da classe.

Para o Ensaio Cometa se faz necessário a preparação previa de laminas cobertas com agarose normal e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP). Estas etapas serão descritas a seguir.

ANEXO III – PROTOCOLO COMPLETO PARA A PREPARACAO DA AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSAO (LMP)

a) Dissolve-se 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS que foi levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.

b) Esta agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando é então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

ANEXO IV – PROTOCOLO COMPLETO PARA A PREPARACAO DA AGAROSE NORMAL

a) Deve-se dissolver 1,5g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura então é levada ao forno de micro-ondas até sua fervura e completa dissolução.

b) Após fervura, a agarose deve ser deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta deve ser picada e levada novamente ao forno de micro-ondas. Ao final, a agarose deve ser mantida em banho-maria a 70°C.

c) As lâminas, previamente limpas, deverão ser mergulhadas na agarose aquecida, sendo que o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada foi limpo com um lenço de papel.

d) As lâminas serão deixadas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente para solidificar a cobertura de agarose.