

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

DENIS DAMASIO

**BIOINDICADORES NA AVALIAÇÃO AMBIENTAL EM UM RIO DE  
ABASTECIMENTO PÚBLICO**

DOIS VIZINHOS - PR

2017

DENIS DAMASIO

**BIOINDICADORES NA AVALIAÇÃO AMBIENTAL EM UM RIO DE  
ABASTECIMENTO PÚBLICO**

Trabalho de Conclusão do Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial para a obtenção do título de biólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi

Coorientadora: Biol. Aliciane de Almeida Roque

DOIS VIZINHOS - PR

2017



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Trabalho de Conclusão de Curso nº \_\_**

### **BIOINDICADORES NA AVALIAÇÃO AMBIENTAL EM UM RIO DE ABASTECIMENTO PÚBLICO**

por

DENIS DAMASIO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 15 horas do dia 23/11/2017, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Membro 1  
Prof. Dr. Cleverson Busso

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nédia de Castilhos Ghisi  
Orientadora  
UTFPR – Dois Vizinhos

---

Membro 2  
Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira

---

Coordenador do Curso de Ciências  
Biológicas  
UTFPR – Dois Vizinhos

**“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.**

A todos que me conduziram no enfrentamento das dúvidas e percalços, tornando esta caminhada possível. A Deus. A meus pais e familiares. A amigos. E também a inimigos, que foram o combustível e o estímulo para superação. A todos os professores que serviram de exemplo e que fizeram parte da minha história.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela possibilidade e pelo prazer de viver e dividir o espaço e o tempo com inúmeras pessoas maravilhosas.

A Profa. Nédia, pela extrema paciência e por ter me aceitado como orientado, proporcionando sábios conselhos e adequada dose de autonomia na condução de trabalhos. Agradeço também do fundo do coração pela grande generosidade.

A Juliana, minha maior incentivadora, que nunca perdeu a fé em minha capacidade de vencer problemas e desafios.

A minha mãe, Mafalda, que mesmo diante de amarga labuta, sempre foi livre de rancores e sempre acreditou e incentivou os estudos de seus filhos, se sacrificando de inúmeras formas.

Ao Alex, pelos ensinamentos práticos no Laboratório de Microbiologia, que se mostrou de grande ajuda para o desenvolvimento dos experimentos deste trabalho.

O meu muito obrigado aos grandes amigos de curso e de universidade, pelos momentos de diversão e de conhecimento extraclasse, que contribuíram para tornar a caminhada menos íngreme.

Ao meu pai, Valdir, pelas amargas e duras lições de vida, também pelos bons exemplos de honestidade e trabalho duro.

Ao Roque e sua família, por terem permitido, por exaustivas vezes, o acesso ao rio através de sua propriedade residencial.

Aos colegas do grupo *dogfish* pelo companheirismo e pela camaradagem nos gélidos dias de coleta.

Aos programas de fomento à pesquisa e de bolsas de iniciação científica.

A Universidade pela infraestrutura e apoio, e sobretudo pelos programas de permanência estudantil.

Agradeço também a co-orientadora pelas contribuições com este e outros trabalhos.

Aos professores Elton e Cleverson por ter me concedido o prestígio de integrarem a banca de defesa e pelos valorosos ensinamentos e contribuições para este trabalho e ao longo de todos os anos de curso.

Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

## RESUMO

DAMASIO, Denis. **Bioindicadores na avaliação ambiental em um rio de abastecimento público**. 2017. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

Este trabalho realizou o monitoramento ambiental do Jirau Alto, rio de abastecimento público localizado no município de Dois Vizinhos, sudoeste do Paraná, através de análises histopatológicas de fígado de *Astyanax bifasciatus* e da concentração de coliformes. A coleta dos exemplares de *A. bifasciatus*, ocorreu a partir de quatro pontos amostrais e durante duas estações (inverno e verão). Os pontos amostrais foram distribuídos em: P1- localizado em uma região agrícola e mais próximo a nascente do rio. Em P2, no início do perímetro urbano, com a influência de moradias e atividade agroindustrial de um frigorífico. P3 situado no Parque Ecológico Municipal do Jirau Alto, onde o P4, a sua jusante, está próximo a foz do rio estudado, onde ocorrem esgotos clandestinos nas proximidades. Os espécimes do rio, foram comparados com um ponto referência de uma APP, localizado na UTFPR do campus de Dois Vizinhos. Os fígados dos exemplares coletados foram fixados, desidratados e processados segundo procedimento histológico usual. As alterações histopatológicas observadas em microscópio óptico, foram avaliadas segundo o grau de reversibilidade e extensão do dano. Posteriormente, os danos foram submetidos a análise estatística para comparação das medianas. Nas análises bacteriológicas, determinou-se o número mais provável (NMP) de coliformes das amostras de água coletadas mensalmente no rio, durante 6 meses, através da técnica convencional dos tubos múltiplos, com série de 5 tubos, com diluições de 1, 01 e 001 ml. Os valores obtidos foram comparados com os limites prescritos nas normas do CONAMA Nº 357/2005. Os resultados mostraram que os valores de Coliformes Termotolerantes ficaram dentro dos limites prescritos em lei para rios de classe 2. Porém, a água do rio Jirau Alto revelou-se imprópria para dessedentação de animais e balneabilidade durante a maior parte dos meses monitorados, por apresentar valores acima dos 1000NMP/100ml. O ponto P3, em ambas as estações, apresentou os maiores índices de danos histopatológicos, assim como os maiores valores de coliformes termotolerantes. Este resultado pode ser relacionado a esgotos clandestinos, desmatamento, e as pressões socioeconômicas e imobiliárias no entorno do Parque Ecológico Municipal.

**Palavras-chave:** Poluição. Biomonitoramento. Biomarcadores. Xenobióticos.

## ABSTRACT

DAMASIO, Denis. **Bioindicators in environmental assessment in a river of public supply.** 2017. 45 f. Course Completion Work (Undergraduate Degree in Biological Science - Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

This project carried out the environmental monitoring of Jirau Alto, a public water supply river located in the municipality of Dois Vizinhos, southwest of Paraná, through histopathological analyzes of the liver of *Astyanax bifasciatus* and the concentration of coliforms. The collection of the *A. bifasciatus* specimens occurred from four sampling points and during two seasons (winter and summer). The sampling points were distributed in: P1- located in an agricultural region and closer to the source of the river. In P2, at the beginning of the urban perimeter, with the influence of housing and agroindustrial activity of a refrigerator. P3 located in the Jirau Alto Municipal Ecological Park, where P4, downstream, is close to the mouth of the studied river, where clandestine sewage occurs nearby. The specimens of the river were compared to a reference point of an APP, located in the UTFPR of the Dois Vizinhos campus. The livers of the collected specimens were fixed, dehydrated and processed according to the usual histological procedure. The histopathological changes observed under an optical microscope were evaluated according to the degree of reversibility and extension of the damage. Subsequently, the damages were submitted to statistical analysis to compare the medians. In the bacteriological analyzes, the most probable number (MPN) of coliforms of the water samples collected monthly in the river was determined, for 6 months, using the conventional technique of multiple tubes, with a series of 5 tubes, with dilutions of 1, 01 and 001 ml. The values obtained were compared to the limits prescribed in the CONAMA norms No. 357/2005. The results showed that the values of Thermotolerant Coliforms were within the limits prescribed in law for rivers of class 2. However, water from the Jirau Alto River proved to be unfit for animal watering and bathing during most of the monitored months, for values above 1000NMP / 100ml. The P3 point in both seasons had the highest indexes of histopathological damage, as well as the highest values of thermotolerant coliforms. This result may be related to clandestine sewage, deforestation, and socioeconomic and real estate pressures around the Municipal Ecological Park.

**Keywords:** Pollution. Biomonitoring. Biomarkers. Xenobiotics.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2 REVISÃO LITERÁRIA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Impactos ambientais .....	6
2.2 Biomonitoramento .....	8
2.3 Peixes como Bioindicadores .....	9
2.4 Microrganismos como bioindicadores .....	10
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivo geral .....	14
3.2 Objetivos específicos .....	14
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
4.1 Espécie bioindicadora .....	15
4.2 Área de estudo .....	15
4.3 Procedimento amostral histológico.....	18
4.3.1 Protocolo histológico de fígado .....	19
4.3.2 Análise qualitativa das lâminas histológicas e quantificação dos danos .....	19
4.4 Determinação de coliformes.....	20
4.4.1 Coleta das amostras de água superficial.....	20
4.4.2 Teste Presuntivo para Coliformes .....	21
4.4.3 Teste Confirmativo para Coliformes Totais .....	21
4.4.4 Teste Confirmativo para Coliformes Termotolerantes .....	21
4.5 Análise de dados.....	22
4.5.1 Histopatologias.....	22
4.5.2 Coliformes .....	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
5.1 Histopatologias de fígado .....	23
5.2 Coliformes Termotolerantes .....	27
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
REFERENCIAS .....	33

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre poluição aquática vêm ganhando crescente destaque e atenção por parte da comunidade científica. Isso ocorre à medida que muitas atividades antrópicas acabam degradando o meio ambiente e como consequência a saúde das pessoas e demais organismos que também ficam comprometidos (MORENO; CLLISTO, 2005).

Uma das maneiras de averiguar o efeito dos poluentes provenientes das mais diversas fontes de emissão que são carregados para os corpos hídricos, é fazendo uso de organismos bioindicadores (MCCARTHY; HALBROOK; SHUGART, 1991). Os organismos ou comunidades utilizadas como bioindicadores devem ser suficientemente sensíveis a mudanças ambientais. Essa sensibilidade deve apresentar reações que demonstrem mudanças em seu padrão normal. As mudanças podem ser em funções vitais e/ou em sua composição química, possibilitando assim, a obtenção de informações sobre a situação em que se encontra o ambiente (ZHOU et al., 2008).

Dentre vários organismos, peixes são escolhidos como bioindicadores por justamente apresentarem características vantajosas. Entre estas características, pode-se citar que esses organismos estão distribuídos em quase todos os ecossistemas aquáticos, até mesmo nos ambientes poluídos; existe abundante literatura sobre sua biologia e ecologia; Além disso, os peixes são de fácil manipulação; ocupam vários níveis tróficos, fazendo inclusive, parte da alimentação humana e possuem uma vida longa o suficiente para fornecer um registro de *stress* ambiental (WHITFIELD; ELLIOTT, 2002).

Existem vários parâmetros que podem ser avaliados nos organismos bioindicadores. Dentre estes, alguns são denominados de biomarcadores, que são, por definição, as respostas biológicas que ocorrem devido a exposição a agentes estressores, como, por exemplo, efluentes urbanos sem tratamento adequado (PANDEY et al., 2006). A exposição pode ser avaliada por mudanças em diferentes níveis de organização (TRUJILLO-JIMNEZ et al., 2011). As mudanças podem ocorrer em parâmetros bioquímicos, celulares, fisiológicos, ou mesmo, comportamentais, permitindo uma avaliação precoce sobre os efeitos da poluição sobre o ecossistema, prevenindo danos maiores a este (PEREIRA et al., 2013).

Para melhor refletir o estado ambiental, programas de biomonitoramento e manejo de ecossistemas aquáticos continentais utilizam um conjunto de biomarcadores, contemplando processos ocorridos anteriormente ao momento de coleta dos espécimes (FRENZILLI et al., 2004).

Dentre os biomarcadores mais utilizados para diagnóstico de danos a ambientes aquáticos, se encontram as histopatologias em fígado de peixes (MELA et al., 2013). Este biomarcador permite constatar a presença de alterações teciduais, como respostas inflamatórias, acúmulo de gordura e necrose. Estas alterações podem ocorrer em consequência de uma série de danos a nível tecidual causados por poluentes (SILVA, 2015). Responsivas e confiáveis, as histopatologias também permitem avaliar a presença de substâncias com efeitos negativos ao órgão estudado (PEREIRA et al., 2013).

Para se validar a presença de contaminação por descargas orgânicas de efluentes urbanos ou agropecuários que não passaram por tratamento adequado, é comum averiguar conjuntamente a presença de coliformes termotolerantes no corpo hídrico, complementando a avaliação e caracterização do ambiente quanto ao seu estado ambiental, e a qualidade da água (CROWTHER; KAY; WYER, 2001). Vários estudos atribuem problemas observados em bioindicadores a poluição por esgoto (FREIRE et al., 2015; GHISI et al., 2016; TEJEDA-VERA; LÓPEZ-LÓPEZ; SEDEÑO-DÍAZ, 2007; TRIEBSKORN et al., 2008) , mas poucos fazem esta associação avaliando simultaneamente com biomarcadores histológicos em peixes e coliformes (KURTOVIĆ, et al., 2009).

Uma grande quantidade de doenças que acometem países em desenvolvimento provêm da água contaminada. Esta também é responsável pelas maiores taxas de mortalidade infantil e da população com imunidade debilitada. Os coliformes, são um dos mais frequentes grupos de bactérias utilizados para associar a contaminação das águas por esgoto não tratado e doenças de veiculação hídrica (NETTO et al., 2009).

Com a proliferação crescente de coliformes termotolerantes em águas de acesso e uso público, tem crescido a preocupação com as consequências na saúde pública, para o meio ambiente e setor econômico, podendo-se destacar o aumento de custos com tratamento de água para o abastecimento público (CROWTHER; KAY; WYER, 2001).

Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi realizar um monitoramento da qualidade das águas do principal corpo hídrico para abastecimento público da cidade de Dois Vizinhos no Paraná. Para este estudo, o lambari do rabo vermelho *Astyanax bifasciatus* (Garavello & Sampaio, 2010) foi utilizado como espécie bioindicadora, e as suas histopatologias em fígado como biomarcador. Este trabalho também buscou determinar a concentração de coliformes como importante parâmetro na validação da presença de contaminação por esgoto.

## 2 REVISÃO LITERÁRIA

### 2.1 Impactos ambientais

Impacto ambiental, segundo a resolução do CONAMA n.º 01 de 23/01/1986, pode ser definido como mudanças nas propriedades do meio ambiente, sejam elas químicas, físicas ou biológicas. Atividades humanas que comprometam as próprias atividades socioeconômicas, bem como a biodiversidade, condições sanitárias e os recursos ambientais, bem como sua qualidade (CONAMA, 1986).

A expressiva queda na qualidade da água e a perda de biodiversidade aquática que vem ocorrendo nas últimas décadas, está fortemente relacionada a atividades antrópicas que causam a desestruturação do ambiente natural (RAMSDORF et al., 2012). A medida que a sociedade foi ficando mais complexa, os problemas ambientais foram migrando para uma abrangência mais séria e global (LAYRARGUES, 1999).

Uma das principais fontes poluentes é a liberação de descargas industriais e agrícolas, bem como de resíduos urbanos, que vem prejudicando a qualidade da água a um ritmo alarmante. Corpos de água doce são os principais locais de descarte destes resíduos. Como resultado, os ambientes aquáticos continentais são impactados negativamente pela liberação destes efluentes industriais e também pelo lançamento de esgoto não tratado, contribuindo para o acúmulo de poluentes nos ecossistemas (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004).

Este quadro de poluição e prejuízos econômicos vem gerando um aumento na consciência ambiental, onde percebe-se que prevenir os impactos oriundos de projetos de desenvolvimento econômico é melhor que corrigir os danos ambientais gerados por estes. Criar condições onde progresso e preservação possam coexistir em produtiva harmonia, constitui o chamado desenvolvimento sustentável (ASHLEY, 2007).

Segundo Piltan et al. (2011), com o crescente uso de fertilizantes sintéticos e defensivos agrícolas, a qualidade da água vem sendo prejudicada por inúmeras vias, como a deposição de agroquímicos, lixiviação de águas de irrigação e drenagem. É importante lembrar que o uso destes insumos é reconhecidamente necessário e visa assegurar o aumento na produção de alimentos para uma população de elevadas taxas de crescimento (KRÜGER, 2009).

Em consequência da pressão ambiental exercida pelas atividades agrícolas sobre os ecossistemas, cresce proporcionalmente a possibilidade destes insumos atingirem níveis tóxicos nos ambientes naturais. Nos padrões atuais, é possível apenas limitar o uso de

fertilizantes e pesticidas, mas dificilmente será possível aboli-los. Existem métodos e normas para aplicação destes insumos com o objetivo diminuir o número de aplicações, sua quantidade no ambiente e conseqüentemente sua acumulação na cadeia trófica (ZHOU et al., 2008); no entanto, muitas vezes, estas normas não são empregadas propositalmente pelos usuarios, visando um lucro maior a curto prazo.

Com o acúmulo destes poluentes nos corpos de água, sejam proveniente da urbanização ou de atividades agropecuárias, ocorre o aumento de nutrientes que acarretam a eutrofização, causando tanto a diminuição dos níveis de oxigênio, como a acidificação e liberação de toxinas na água, o que por fim pode gerar radicais mudanças no ecossistema, podendo comprometer até o abastecimento público das populações humanas, bem como a atividade pesqueira (GRISOLIA, 2001).

Esse processo de eutrofização é gerado, sobretudo devido à entrada demasiada de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio dissolvidos, frequentemente associados ao esgoto doméstico e a lixiviação de fertilizantes agrícolas. Com o excesso de nutrientes disponíveis, cria-se condições à proliferação desequilibrada de algas, cianobactérias e macrófitas aquáticas no corpo hídrico (ROUND, 1991).

Grande quantidade de defensivos agrícolas são utilizados atualmente, muitos com substâncias biologicamente ativas e com grande potencial para causarem efeitos nocivos no meio ambiente (FOCHTMAN; RASZKA; NIERZEDSKA, 2000). A falta de seletividade por parte destas moléculas afeta não somente as espécies praga de interesse, mas também uma ampla quantidade de organismos não-alvo. Essas moléculas podem ser introduzidas em corpos aquáticos por escoamento agrícola pela ação da chuva, processo também facilitado pelo excesso na aplicação. Uma vez fora do ambiente ao qual foi destinado, representa significativo risco toxicológico para os organismos residentes (AGBOHESSI et al., 2015).

A permanência de determinados pesticidas no ambiente, especialmente os hidrocarbonetos clorados, demonstram como esses resíduos podem também permanecer nos alimentos e representar riscos a alimentação humana e animal. Vários estudos já foram realizados para detectar esses resíduos de pesticidas em peixes e indicaram que organoclorados são, em geral, os agrotóxicos mais encontrados, especialmente o DDT (RABITTO et al., 2011).

A acumulação destas substâncias, bem como de metais pesados provenientes do processo de industrialização e urbanização pode acarretar em bioacumulação destes na cadeia trófica. Esse fato também se relaciona geralmente com mudanças fisiológicas nos tecidos e sua disfunção (STENTIFORD et al., 2003). Estas substâncias são também chamadas de

xenobiontes, isto é, substâncias estranhas ao organismo que acarretam consequências negativas.

Os metais pesados também são um grupo de poluentes aquáticos importantes devido à sua bioacumulação e suas propriedades não-biodegradáveis. Seu despejo excessivos nos ecossistemas aquáticos devido a atividades industriais tem gerado muitas preocupações ambientais e de saúde em todo o mundo (VASANTHI et al., 2013).

Em 1962 a bióloga norte americana Rachel Carson publicou o livro “Primavera Silenciosa”, no qual abordou pela primeira vez o problema da bioacumulação. Com base em inúmeros estudos, a pesquisadora faz o relato dos efeitos nocivos da introdução e uso irresponsável de defensivos agrícolas. Nesta mesma obra, são abordadas as consequências do uso e pulverização do diclorodifeniltricloroetano (DDT), inseticida que se acumula no ambiente e que está estreitamente relacionado com o aumento nos casos de câncer e inúmeras outras doenças em diversas espécies animais, incluindo o ser humano (CARSON, 1962).

Hormônios, pesticidas e metais, bem como outros micropoluentes, atualmente, não possuem tratamento para a sua redução ou eliminação por parte da maioria das estações de tratamento de água e esgoto do Brasil (HÄFELI; SCHWARTZ; BURKHARDT-HOLM, 2011). Uma vez no ambiente, esses xenobióticos podem ser incorporados pelos organismos residentes, comprometendo a disponibilidade dos mesmos como fonte de alimento para as populações humanas. Um modo de diagnosticar tais riscos, é através da realização de programas de biomonitoramento.

## **2.2 Biomonitoramento**

A medida em que ocorrem graves distúrbios nos ecossistemas, associado a entrada de xenobióticos, os programas de biomonitoramento tornam-se de suma importância, pois os efeitos destes poluentes podem ser avaliados e os resultados destes estudos podem embasar programas de conservação e leis regulamentadoras (GHISI et al., 2014).

Em ecossistemas aquáticos, a avaliação dos impactos ambientais vem sendo feita pela análise de alterações nas concentrações de inúmeras variáveis físico-químicas. A determinação de variáveis biológicas, como coliformes totais e termotolerantes, juntamente com o sistema de variáveis físico-químicas, se mostra atualmente como um importante componente na classificação dos rios nas chamadas classes de qualidade da água. Caracteriza-se assim como importante ferramenta para o enquadramento quanto a padrões de potabilidade

e balneabilidade (GOULART; CALLISTO, 2003). O sistema de monitoramento que utiliza variáveis físico-químicas apresenta vantagem e desvantagens. Na avaliação de impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos, a identificação de concentrações alteradas nas propriedades físico-químicas da água se mostra bastante útil. Neste sistema, entretanto, as amostragens apresentam descontinuidade temporal e espacial. Em uma situação altamente dinâmica, como no caso de ambientes aquáticos lóticos, a análise físico-química pode estar representando somente uma fotografia instantânea e pontual, caracterizando assim, uma das desvantagens (BUSS; BAPTISTA; NESSIMIAN, 2003). O monitoramento físico e químico da água também é ineficiente na detecção de alterações na diversidade de habitats. As consequências sobre as comunidades biológicas devido a alteração da qualidade de água também ficam obscuras levando em conta apenas esse parâmetro (GOULART; CALLISTO, 2003).

Desta maneira, o ideal é sempre uma associação de parâmetros abióticos com parâmetros biológicos, pois o primeiro irá caracterizar o ambiente, enquanto o segundo irá mostrar a situação a longo prazo e os efeitos acumulados nos organismos residentes (BORJA; RANASINGHE; WEISBERG, 2009).

### **2.3 Peixes como Bioindicadores**

O uso de peixes em programas de biomonitoramento, representa uma estratégia de baixo custo para uma avaliação inicial da qualidade da água e pode fornecer informações importantes para descrever mudanças na saúde ambiental de bacias hidrográficas (MACHADO et al., 2014). Os peixes tem sido comumente usados como organismos bioindicadores de poluição ambiental (NWANI et al., 2013). Bioindicador é o termo empregado para aqueles organismos que podem fornecer informações que refletem condições ambientais adversas. Em um organismo bioindicador, podem ser avaliados vários biomarcadores, sendo este último a caracterização de mudanças teciduais, celulares e moleculares no organismo avaliado (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996).

O uso de peixes para avaliar o estado ambiental de rios vem obtendo um crescente interesse, sobretudo biomarcadores em espécies nativas, combinação considerada uma excelente ferramenta na obtenção de informações sobre o efeito de poluentes em ambientes naturais (DEPLEDGE; FOSSI, 1994). Peixes são especialmente sensíveis a vários poluentes, pois mostram a exposição de diferentes níveis na teia trófica, respondendo aos agentes

mutagênicos até em baixas concentrações. Além disso, os peixes podem evidenciar o perigo potencial de produtos químicos presentes no ambiente aquático (BÜCKER et al., 2012).

Nestes organismos, estudos patológicos podem incluir vários procedimentos, tais como necropsias, exames histológicos, enzima hepática, ensaios e exames parasitológicos (WHITFIELD; ELLIOTT, 2002). Os exames histológicos para averiguar a presença de alterações a nível tecidual, consiste em uma técnica eficaz e relativamente rápida, se enquadrando entre um dos principais métodos de detecção do nível dos efeitos tóxicos em órgãos e tecidos.

As histopatologias de fígado são consideradas excelentes biomarcadores para essa finalidade, uma ferramenta útil na detecção de efeitos tóxicos de compostos químicos em órgãos-alvo (SCHWAIGER et al., 1997). Além disso, fornecem uma ideia sobre o estado de saúde dos peixes no ambiente (GHISI, 2013). Este importante órgão, desempenha funções elementares no metabolismo e é o principal órgão de biotransformação, excreção e acumulação de contaminantes em peixes (STRMAC; BRAUNBECK, 2002).

## **2.4 Micro-organismos como bioindicadores**

Os micro-organismos também podem ser usados como indicadores da qualidade da água devido a sua grande distribuição e abundância na natureza. Atualmente as bactérias consideradas como indicadores biológicos da qualidade da água são utilizadas para indicar duas situações possíveis: a contaminação fecal e a presença de patógenos que indicam um potencial risco a saúde (VINAY et al., 2005).

A deposição de material de origem fecal nos rios acaba adicionando à água alguns organismos que também habitam os seres humanos como parte da microbiota normal. Dentre os organismos que fazem parte da flora intestinal humana, podemos destacar as bactérias do grupo coliformes. As bactérias deste grupo não causam maiores problemas, quando encontradas no interior do intestino. Na verdade, esses microrganismos atuam auxiliando no processo de digestão, porém, a presença destes na água, indica que o referido corpo aquático recebeu descargas de dejetos recentemente, seja de origem humana, ou de outros animais homeotérmicos (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Se a água recebe dejetos, ela também pode facilmente receber microrganismos patogênicos. A contaminação da água com vários organismos patogênicos pode ocasionar a transmissão de várias doenças, através do contato com esta água contaminada (NEILL, 2004).



Existe uma grande associação entre o abastecimento de água, esgoto sanitário e saúde. Vários autores procuram dar conta da complexidade dessa relação, explicando a influência sobre indicadores específicos, como a diarreia, ou sobre medidas mais abrangentes de saúde, como a mortalidade infantil ou a expectativa de vida (WALDMAN; MONTEIRO, 1999).

Segundo o IBGE (2016) 1/3 dos domicílios brasileiros não é conectada à rede coletora de água e 68% não são atendidos por sistema coletivo de esgotos. Além disso, uma parcela considerável da população abastecida, recebe água intermitentemente e com qualidade duvidosa. Além disso, quase a totalidade dos esgotos coletados são lançados nos cursos d'água sem receber qualquer tipo de tratamento ou com tratamento inadequado.

Nesse sentido, a determinação da concentração dos coliformes assume importância como parâmetro indicador da possibilidade da existência de micro-organismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifoide, febre paratifoide, disenteria bacilar e cólera (SANTOS; HENRIQUE, 2007).

No Brasil, os padrões da qualidade da água são estabelecidos através da Resolução nº 357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), de 17/03/2005. Essa resolução também estabelece os padrões e condições para o lançamento de efluente (CONAMA, 2005).

A Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, também dispõe sobre os padrões de potabilidade e qualidade da água para consumo humano. Essa portaria define as bactérias coliformes em dois grupos: totais e termotolerantes. Os coliformes totais, são representados por bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de desenvolver-se na presença de sais biliares, fermentando a lactose com produção de ácido e gás. São também caracterizadas por serem bacilos aeróbios ou anaeróbios facultativos e também oxidase-negativos. Os coliformes termotolerantes, são um subgrupo dos coliformes totais. Esse subgrupo é principalmente representado pela *Escherichia coli*, bactéria de origem exclusivamente fecal. Essa portaria também estabelece que, a ocorrência de coliformes totais nas amostras, mesmo em um teste presuntivo, já descarta a água para o consumo humano sem tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Portanto, a análise dos coliformes termotolerantes (erradamente chamados de coliformes fecais) é útil e pode ser usada para ajudar a determinar a origem da contaminação da água.

Deve-se levar em conta que, mesmo possuindo origem fecal, uma vez introduzidas na água, muitos coliformes podem adaptar-se ao meio aquático, principalmente em climas tropicais. A tendência atual, portanto, é de se referir ao grupo como coliformes termotolerantes. Entretanto, usualmente ocorrem no esgoto sanitário, o predomínio da *Escherichia coli*, e como é considerado um organismo de origem exclusivamente fecal, o

grupo ainda é largamente utilizado como parâmetro da qualidade da água (BATISTA; FUCKS, 2012). A *E. coli* é uma bactéria da família Enterobacteriaceae que apresenta atividade da enzima  $\beta$ -glicuronidase. A partir do aminoácido triptofano, produz indol, sendo a única espécie do grupo de coliformes termotolerantes a exclusivamente habitar animais homeotérmicos como o ser humano (CONAMA, 2005).

Os coliformes também são um grupo que compreendem várias espécies de bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*, mas em maior extensão, compreende o gênero *Escherichia*. Águas ricas em matéria orgânica podem apresentar algumas destas espécies, como, por exemplo, *Klebsiella pneumoniae*, que também pode habitar solos com matéria vegetal decomposto (DOYLE; ERICKSON, 2006).

A verificação da presença de coliformes é feita de maneira relativamente fácil. Por serem bactérias que fermentam o meio de cultura lactosado, acabam gerando, além de ácidos, dióxido de carbono. O produto do metabolismo dessas bactérias pode ser verificado pela formação de bolhas nos tubos de Durham. Os coliformes totais e termotolerantes distinguem-se pela sua capacidade de crescimento ótimo a temperaturas distintas: 30° C para os coliformes totais e aproximadamente 44,5° C para os coliformes termotolerantes. É com base nesta propriedade (entre outras) que se faz a sua detecção laboratorial (LIBÂNIO, 2008).

O Método do Número Mais Provável é um dos testes de detecção laboratoriais que permite tanto verificar a presença de coliformes, quanto a sua quantidade aproximada existente em cada amostra. Neste método, as amostras são inoculadas em diluições decimais em séries de tubos com meio seletivo. A densidade bacteriana é obtida através da quantidade verificada de tubos que apresentam crescimento nas diferentes diluições. Esses valores são comparados com os existentes na tabela designada por tabela do NMP, que por sua vez, fornece o valor aproximado da densidade bacteriana de acordo com a quantidade de tubos positivos para cada diluição (MARQUEZI, 2010).

Dois Vizinhos é um município localizado no sudoeste do Paraná, com 40.000 habitantes segundo censo do IBGE, 2015. Possui uma área territorial de 418 Km<sup>2</sup> e sua economia é principalmente baseada na agroindústria. Economicamente possui grande destaque para produção de carne de frango, cuja produção anual é superior a 130 mil toneladas, por vezes chamada de ‘capital do frango’ devido a isso (PREFEITURA MUNICIPAL DE DOIS VIZINHOS, 2016). Este município possui clima subtropical úmido, sem estação seca e com geadas frequentes durante o inverno. O regime de chuvas é bastante distribuído ao longo de todos os meses do ano (GALVANI, 1992). Dentre os rios que correm pelo município, destaca-se o rio Jirau Alto, do qual se capta água para abastecimento da

cidade. Este rio atravessa a cidade de oeste para leste, nascendo dentro do próprio município e desaguando no rio Dois Vizinhos, ainda dentro do perímetro da cidade (PIGOSSO et al., 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Inferir sobre a qualidade da água no rio Jirau Alto, Dois Vizinhos Paraná, utilizando-se como parâmetros as histopatologias de fígado de *Astyanax bifasciatus* e a determinação da concentração de bactérias do grupo coliformes termotolerantes.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a. Confeccionar lâminas permanentes com o tecido hepático da espécie bioindicadora *Astyanax bifasciatus*
- b. Reconhecer e diferenciar cada tipo de lesão hepática no organismo bioindicador.
- c. Comparar estatisticamente as histopatologias de fígado entre os pontos, através do índice de lesão.
- d. Determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes para cada ponto de coleta.
- e. Para os danos histopatológicos, testar a partir dos dados estatisticamente analisáveis, se há diferença entre os locais e os períodos de coleta.
- f. Relacionar os dados obtidos com a importância na conservação dos rios e seu entorno.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Espécie bioindicadora

Para este estudo, como organismo bioindicador, foi selecionada a espécie de peixe *Astyanax bifasciatus*, um Characiforme onívoro e endêmico da bacia do rio Iguaçu. Também conhecida como lambari do rabo vermelho (fig. 1), sua elevada ocorrência no rio estudado, somados ao fácil transporte e manuseio em laboratório, viabilizou o uso desta espécie como bioindicadora. Os peixes foram coletados e manipulados mediante licença de coleta de animais silvestres concedida pelo ICMBio (documento n°: 50414-1) e protocolo autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UTFPR / com o protocolo n°. 2015-20).



**Figura 1** – Imagem de um exemplar da espécie bioindicadora estudada, *Astyanax bifasciatus*, capturado no rio Jirau Alto. Barra = 1cm.

Fonte: Nédia Ghisi, (gentilmente cedido de seu acervo pessoal).

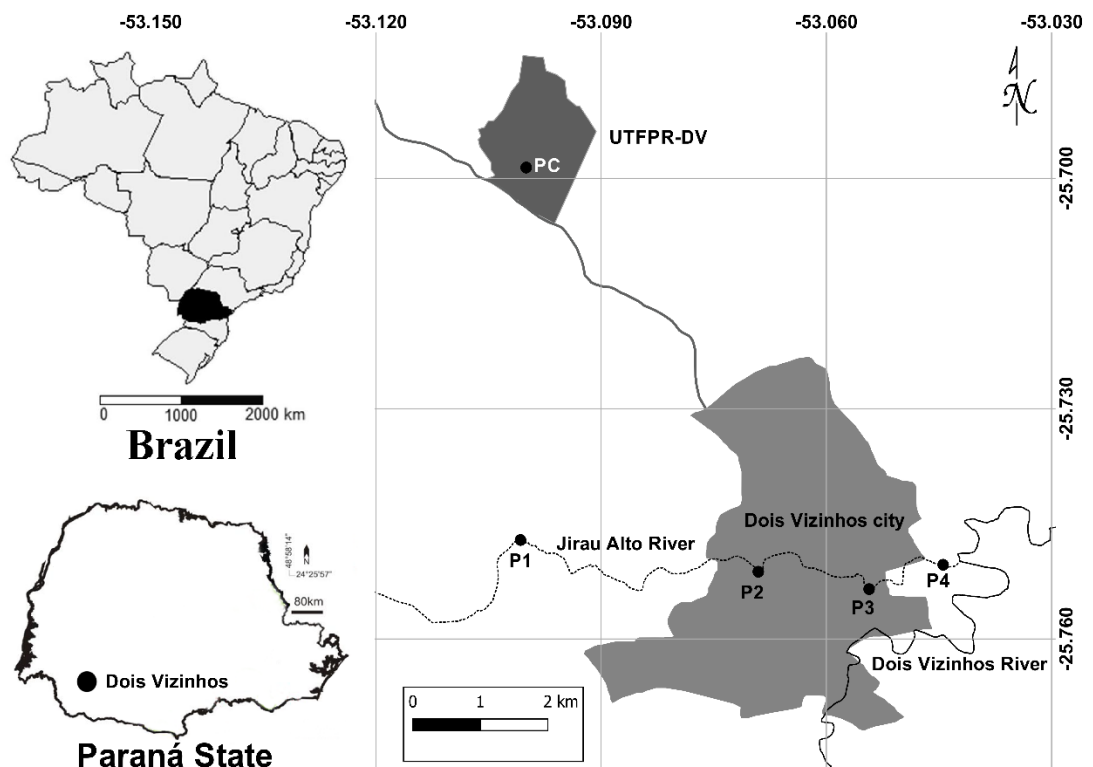
### 4.2 Área de estudo

A microbacia hidrográfica do rio Jirau Alto possui uma área total de 31,46 Km<sup>2</sup> fazendo divisa com aproximadamente 125 propriedades rurais de pequeno porte. O rio também atravessa a cidade de Dois Vizinhos, fator que somado a grande quantidade de

propriedades agropecuárias, acaba contribuindo com diversos tipos de efluentes de origem antrópica. O rio Jirau Alto está inteiramente localizada no município de Dois Vizinhos, sudoeste do Paraná, que possui aproximadamente 39.138 habitantes e 415 Km<sup>2</sup> de área total (PIGOSSO et al., 2009).

A economia do referido município se baseia no comércio e na agroindústria, com destaque para a avicultura, suinocultura e plantio de grãos. Uma das atividades econômicas que diretamente se relaciona a área de estudo é o setor frigorífico, onde encontra-se uma representante do ramo que muito se utiliza da água do rio. A referida empresa, realiza o abate de suínos e bovinos para a produção de embutidos, liberando efluentes no processo, em lagoas de sedimentação próximas as margens do rio.

Os pontos de coleta para realização do presente trabalho foram distribuídos ao longo do rio Jirau Alto, de acordo com diferentes níveis de interferência antrópica (fig. 2).



**Figura 2** – Área de coleta na microbacia do rio Jirau Alto, região sudoeste do Paraná, Brasil. P1: ponto a montante, região de cabeceira localizada em área rural; P2: ponto após a região de captação de água para abastecimento público e indústria frigorífica; P3: Centro da cidade de Dois Vizinhos, dentro do parque ecológico Jirau Alto; P4: ponto a jusante, próximo a foz no rio Dois Vizinhos. PC: Ponto controle, lago localizado em uma APP nas dependências da UTFPR-DV.

P1 – localizado na região de cabeceira do rio Jirau Alto, nas coordenadas de latitude 25°44'49.1"S e de 53°06'03.1"W longitude, sendo este local protegido por mata ciliar, mas circundado por diversos tipos de atividades agrícolas, por produtores da agricultura familiar.

P2 – situado no início do perímetro urbano e após a captação de água para o abastecimento público, realizado pela Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) e indústria frigorífica. Este ponto, cujas coordenadas são 25°45'03.2"S de latitude e 53°04'09.9"W de longitude, já apresenta um acúmulo de influência agrícola e industrial bem como uma visível escassez ou ausência na cobertura vegetal circundante ao rio.

P3 – localizado nas coordenadas de latitude 25°45'11.3"S e 53°03'15.1"W de longitude, situado em meio ao Parque Municipal Jirau Alto, Unidade de Conservação, dentro do trecho urbano do rio, tendo, por tanto, a influência de descargas de efluentes urbanos.

P4 – ponto situado após o perímetro urbano e próximo a foz no rio Dois Vizinhos nas coordenadas de 25°45'00.5"S latitude e 53°02'42.7"W de longitude.

Os locais de coleta possuem características distintas, conforme indicação no texto supradescrito e nas imagens dos locais, as quais podem ser observadas na Figura 3.

PC – Caracteriza o ponto controle, referente ao represamento para formação de um lago, localizado dentro da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV) nas coordenadas de latitude 25°41'54.37"S e 53°06'00.13"W de longitude. Este lago encontra-se em uma Área de Preservação Permanente (APP), local com menor interferência antrópica e, portanto, utilizado com controle negativo. A APP, como área referência, é um tipo de área de preservação no Brasil. Esta área está regulamentada pela Lei federal 12651/2012 e prevê a finalidade ambiental de propiciar o fluxo gênico tanto de animais quanto de plantas, preservação do solo e do bem estar das populações humanas (BRASIL, 2000).



Figura 3 – Imagens capturadas em cada ponto amostral, representando as condições e características de cada local de coleta.

#### 4.3 Procedimentos para o bioindicador *Astyanax bifasciatus*

Para a elaboração deste trabalho, os dados foram obtidos a partir da coleta dos peixes *Astyanax bifasciatus*, em duas estações (verão de 2015 e inverno de 2016), os quais foram obtidos ao longo de quatro pontos do rio Jirau Alto.

Em cada coleta foram capturados de 8 a 15 indivíduos *A. bifasciatus*, utilizando-se de quatro jogos com três redes de malhas 15, 20 e 25 mm, as quais apresentam  $10 \times 1,5$  m, juntamente com um covos para cada ponto. As redes, juntamente com os covos foram colocadas às margens do rio, uma vez em cada estação (inverno e verão). As redes foram vistoriadas e recolhidas na manhã do dia seguinte até obtenção de um número amostral próximo a 15 exemplares por ponto amostral. Para a captura dos 15 exemplares do ponto controle (PC) foram utilizados covos, expostos durante o mês de setembro de 2016.

Para transportar os indivíduos até o laboratório de triagem, os mesmos foram acondicionados em caixa de isopor com água do próprio local, juntamente com aerador, de modo a mantê-los vivos e em boas condições. Uma vez em laboratório, os peixes foram anestesiados com cloridrato de benzocaína (250mg/L), segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia (CONCEA, 2013). Após a identificação dos indivíduos de acordo com a



quantidade, local da captura e estação, prosseguiu-se com a retirada do fígado de cada exemplar para estudo das histopatologias. Estes órgãos, uma vez retirados, foram acondicionados em frascos com a identificação correspondente e com fixador ALFAC (80% álcool etílico, 15% formol P. A. e 5% ácido acético). Esta solução, foi substituída por álcool etílico 70% após 12 horas, para somente então ter sido iniciado o protocolo de processamento histológico de rotina.

#### 4.3.1 Protocolo histológico de fígado

Com o objetivo de desidratar os fragmentos de fígado, estes foram colocados em série crescente de álcoois por uma hora em cada concentração (80%, 90%, 95% e finalmente a álcool 100%), para posteriormente serem diafanizado (clareamento e desidratação das amostras) em xilol por cerca 60 min. Em seguida, todas as amostras foram incluídas em Paraplast® líquida em estufa a 60°C por 4 horas. Após a solidificação em temperatura ambiente, o material foi trimado e cortado em micrótomo a uma espessura de 7 µm. Em banho-maria, os cortes foram distendidos antes de sua aderência em lâmina, assegurada pela utilização de ovoalbumina, diluída em glicerina a 5%. Hidratadas em concentrações decrescentes de álcool, as lâminas foram posteriormente coradas em Hematoxilina e Eosina, finalizando a montagem destas com bálsamo do Canadá (resina).

#### 4.3.2 Análise qualitativa das lâminas histológicas e quantificação dos danos

As lâminas de fígados foram analisadas através de microscopia de luz de modo a varrer o corte com o cuidado de não repetir as regiões já analisadas. A análise seguiu as definições e critérios padronizados por Bernet et al. (1999), para aplicar as histopatologias como biomarcador. Baseado neste autor, se buscou quantificar e classificar os danos vistos nos órgãos de acordo com importância patológica e extensão das alterações, dividindo-as conforme o protocolo, em reações padrão: reações inflamatórias, distúrbios circulatórios, neoplasias, etc.

As alterações observadas em cada lâmina foram classificadas em fatores de importância (w) que variam de 1 a 3 conforme o grau de reversibilidade do dano, sendo 1 o grau que indica uma baixa lesão; 2 para lesões de nível moderado com a possibilidade de cura caso o elemento causador do estresse deixe de atuar; finalmente 3 para aquelas lesões

patológicas de grande importância, uma vez que são irreversíveis e comprometem a função do órgão de maneira total ou parcial (SILVA, 2015).

As mesmas lesões ou anomalias histológicas foram classificadas também em escores, (a) para uma melhor compreensão dos resultados. O grau de extensão (a) varia de 0 a 6 de acordo com o grau de extensão das anomalias. Recebe (0) quando não há ocorrência; (2) para ocorrência rara ou pouca; (4) para as ocorrências frequentes; e (6) para aquelas muito frequentes. O índice de cada lesão é obtido multiplicando-se o escore pelo fator de importância, para representar a lesão total. O índice do órgão, é calculado pelo somatório dos danos por tipo de reação padrão, através das seguintes fórmulas:

Índice do Órgão (I org.) - representa o grau de dano a um órgão

$$I_{org} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a_{org \ rp \ alt} * w_{org \ rp \ alt})$$

Índice por reação padrão (I org rp) – expressa as lesões por tipo de reação padrão

$$I_{org \ rp} = \sum_{alt} (a_{org \ rp \ alt} * w_{org \ rp \ alt})$$

Onde: org = órgão (constante); rp = reação padrão; alt = alteração, um valor de pontuação =; w = valor de importância.

#### **4.4 Determinação de coliformes**

##### **4.4.1 Coleta das amostras de água superficial**

Foram realizadas coletas mensais nos quatro pontos amostrais pelo período de seis meses contínuos. Posteriormente a coleta, foram efetuadas as análises quantitativas acerca da presença de coliformes totais e termotolerantes. As técnicas usadas para quantificar os coliformes na água são as preconizadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, publicação da *American Public Health Association (APHA)*, *American Water Works Association (AWWA)* e *Water Environment Federation (APHA, 1998)*. O número de cepas foi calculado pelo método do Número Mais Provável (NMP).

Cada amostra de água foi coletada em recipiente devidamente identificado e estéril, com capacidade volumétrica de 100 ml. A partir dos primeiros 15 cm de profundidade a boca do frasco foi direcionada no sentido contrário ao da corrente de água. Em seguida, as amostras foram armazenadas em bolsa térmica, sendo posteriormente levadas até o Laboratório de

Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) para análise.

#### 4.4.2 Teste Presuntivo para Coliformes

Não excedendo o prazo de 8 horas após a coleta, cada amostra foi distribuída em três séries de 5 tubos, com diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 da amostra em relação ao Caldo Lauril Sulfato de Sódio (Caldo Lactosado). Esse caldo foi utilizado nos tubos do teste presuntivo em concentração simples. As amostras de água foram adicionadas aos tubos, em diluição 1:10 nos primeiros 5 tubos. Em outros 5 tubos, foram adicionados 0,1 ml da amostra na proporção de 1:100. Nos demais 5 tubos, foram adicionados 0,01 ml de água na diluição de 1:1000.

Após a inoculação, os tubos foram incubados a temperatura de 35°C por um período de 24/48 horas. Ao final deste período, verificou-se a turbidez do meio e a formação de gás nos tubos de Durham como critério para identificação dos tubos positivos, a serem tomados para utilização no próximo teste microbiológico.

#### 4.4.3 Teste Confirmativo para Coliformes Totais

Para a realização do teste confirmativo para coliformes totais, os tubos do caldo lactosado com resultados positivos nas diferentes diluições foram selecionados. Com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada, procedeu-se com a retirada de uma pequena porção de amostra de cada tubo positivo do teste presuntivo. Esta pequena alíquota foi então, inoculada em tubos correspondentes contendo 10 ml do caldo verde bile brilhante a 2%. A incubação para os tubos deste teste foi realizada a 35°C por um período de 24/48 horas. Novamente, aqueles tubos que apresentaram meio turvo e presença de gás aprisionado nos tubos de Durham, foram considerados positivos para coliformes totais.

#### 4.4.4 Teste Confirmativo para Coliformes Termotolerantes

O teste confirmativo de coliformes termotolerantes, foi realizado após o teste de coliformes totais. Todos os tubos do teste confirmativo para coliformes totais com resultado positivo, foram utilizados para ser transferida uma porção do inóculo com a alça de platina, para os tubos de ensaio contendo 10ml de meio de cultivo caldo EC (*Escherichia coli*) e tubos

de Durham. Assim, os tubos contendo o meio EC, foram deixados em banho-maria e incubados a 44°C durante 24 horas. Após este período, foi verificado a formação de gás, bem como a turbidez do meio, como critério para contagem dos tubos positivos.

## **4.5 Análise de dados**

### 4.5.1 Histopatologias

Foram realizados testes de pressupostos para normalidade e homocedasticidade. Devido a obtenção de dados não paramétricos, as histopatologias entre os pontos de coleta e entre as estações foram avaliadas através da análise estatística de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Mann-Whitney (QUINN; KEOUGH, 2002).

### 4.5.2 Coliformes

Com base na quantidade de tubos positivos obtidos ao final dos testes confirmativos, foi determinado a concentração bacteriana, tanto de coliformes totais, quanto para termotolerantes, existentes nos 100ml de cada amostra. Os valores foram fornecidos pela tabela designada como tabela do NMP (APHA, 1998) que atribui a correspondência da relação de tubos positivos e da concentração bacteriana em 100mL de amostra. Os resultados encontrados por mês e por ponto amostral foram comparados com os padrões estabelecidos pela lei N°357/2005 do CONAMA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Histopatologias de fígado

No tecido hepático, as principais lesões histopatológicas observadas pelas análises qualitativas, foram respostas inflamatórias e vacuolização citoplasmática (Figura 4).

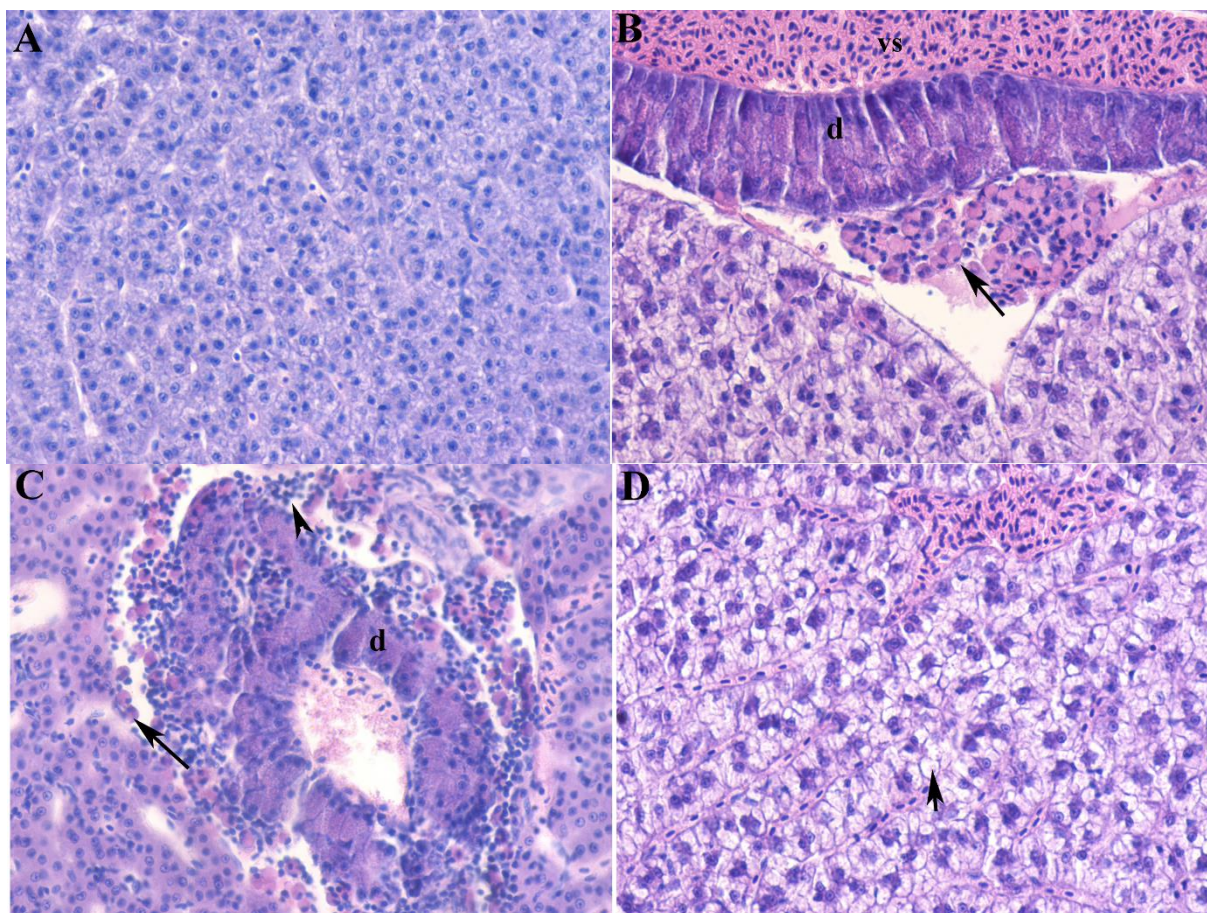
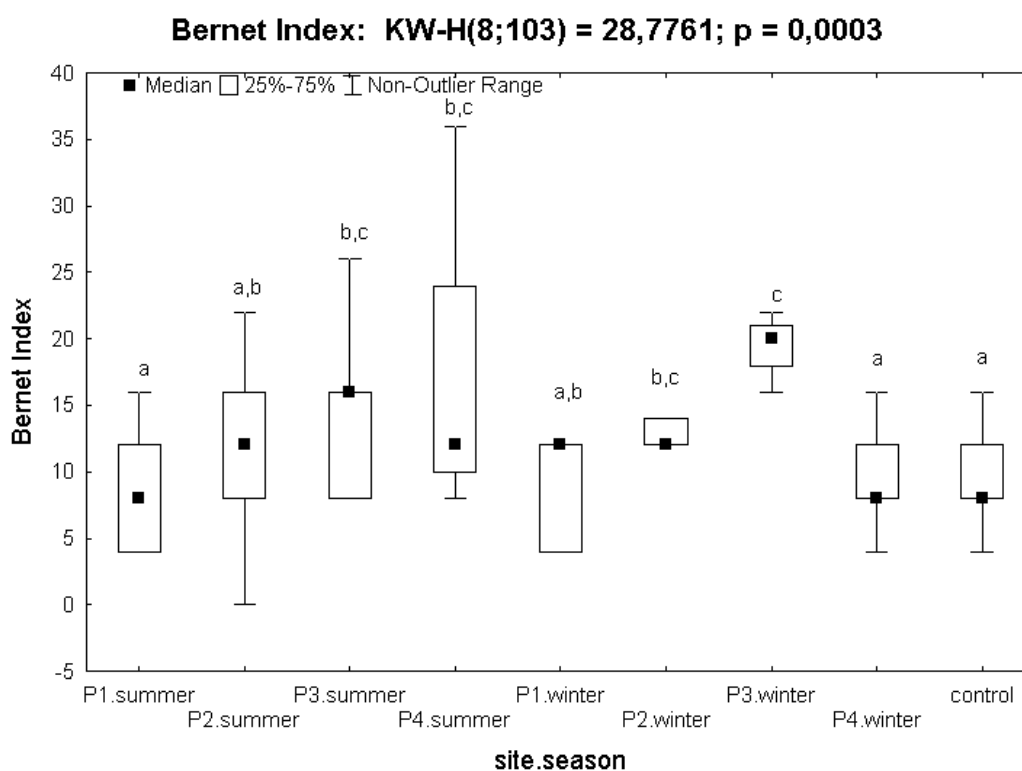


Fig. 4 - A: fígado normal (10X). B-C: vs.vaso sanguíneo; d: ducto; seta: infiltração de leucócitos; cabeça de seta: Infiltração de macrófagos e leucócitos (40 e 10X). D: seta: vesícula citoplasmática ou vacuolização (10X).

As respostas inflamatórias observadas constituíram-se na infiltração do tecido hepático. Foi possível observar a infiltração pelos seguintes tipos celulares: macrófagos e leucócitos, células de defesa com importante papel na resposta imune. Estas células combatem agentes estranhos, removendo, através de fagocitose, partículas estranhas derivadas da degradação celular (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2012).

Já a vacuolização celular, de acordo com o mesmo autor, caracteriza-se como dano em consequência de um estresse químico, suficientemente forte para alterar o metabolismo celular. Assim, a presença de poluentes no ambiente, pode levar a vacuolização do citoplasma, interferindo no funcionamento celular normal, podendo progredir para danos de maior grau, como a necrose ou mesmo a morte celular (apoptose). Esta histopatologia constitui-se de um mecanismo de resposta celular a presença de agentes químicos lipofílicos, como os hidrocarbonetos derivados de petróleo (RIBEIRO, 2007). A célula, numa tentativa de imobilizar tais substâncias, acumula lipídios nas vesículas citoplasmáticas, impedindo assim sua interação com os demais componentes celulares, buscando desta forma minimizar seus efeitos tóxicos (SIMONATO et al. 2008).

Através dos resultados obtidos nas histologias de fígado de *Astyanax bifasciatus*, foi possível constatar alterações hepáticas em exemplares de todos os pontos de coleta do rio Jirau Alto, bem como em ambas as estações do ano analisadas (fig.5).



**Figura 5** – Variação espaço-temporal do índice de Bernet calculado a partir das histopatologias de fígado de *A. bifasciatus* coletados no rio Jirau Alto 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, c) representam diferença significativa no teste de post hoc ( $p < 0,05$ ).

A partir do teste de Mann-Whitney, verificou-se que um gradiente de danos histopatológicos do P1 ao P3, tanto no inverno quanto no verão, sugerindo um aumento

gradativo de poluição de montante a jusante, ficando o P3 durante o inverno, com as maiores taxas de danos histopatológicos. O P1 mostrou-se mais semelhante ao P4 no inverno e ao ponto referência (teoricamente mais preservado).

A semelhança entre os pontos de cabeceira no rio (P1 e P2 verão e P1 inverno), com relação ao ponto controle, pode estar relacionado ao nível de interferência antrópica, relativamente mais baixo nestes pontos. Esta semelhança também pode ser atribuída às características comuns entre o ponto controle e os pontos de influência agrícola (P1 e P2). Embora o nível de preservação do ponto controle seja aparentemente mais elevado, a influência de efluentes agrícolas, devido à proximidade com lavouras nestes pontos, não pode ser totalmente descartada. O eventual uso e liberação de pesticidas como os organofosforados nas proximidades destes pontos, contribuiria para justificar tal semelhança.

Os organofosforados são mundialmente usados na agricultura para o controle de várias pragas, como alguns invertebrados. Esse grupo de pesticidas não possui característica acumulativa nas cadeias tróficas, (RODRIGUES; FANTA, 1998; SILVA et al., 1993; SOGORB; VILLANOVA, 2002). Com isso, sua real periculosidade pode passar despercebida, uma vez que muitos desses compostos podem permanecer em níveis subletais nos organismos (FANTA et al., 2003). Entretanto, vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos podem se alterar em função da contaminação a nível subletal, ao se difundirem nos tecidos dos peixes (SANCHO et al., 1992).

No ponto P2 a taxa de danos apresentou-se como intermediária, quando em comparação ao P1 e P3, para ambas as estações. Foi possível notar, neste trecho do rio, a presença de água com maior turbidez e com forte odor. Isso pode estar relacionado a presença de uma indústria frigorífica, localizada imediatamente a montante do ponto de coleta. A liberação de resíduos orgânicos, como gordura e sangue na água, é uma possível consequência a sua presença junto ao rio (PARDI, 2006). Indústrias também são conhecidas pela contaminação de corpos d'água como decorrência da liberação de substâncias tóxicas em suas descargas de resíduos (ABEL, 1989; KENNISH, 1991).

Os exemplares em P3, tanto no inverno quanto no verão, apresentaram as maiores medianas de danos histopatológicos, estando este resultado, relacionado aos tipos de efluentes urbanos liberados neste trecho do rio. A exemplo, pode-se citar a liberação clandestina de resíduos diretamente na água do rio, como os esgotos domésticos não conectados à rede de esgoto.

No ponto P3, onde se tem uma maior área pavimentada, e maior circulação de automóveis no entorno, ocorre o maior escoamento de hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (HPAs) para dentro do corpo aquático, como resultado da combustão incompleta de motores movidos a combustíveis fósseis, principalmente a diesel (HARVEY, 1991; ALBERS, 1995; BAIRD, 2002). Vale destacar que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de fontes petrolíferas, são um dos grupos de poluentes mais abundantemente encontrados em ambientes aquáticos (KETTRUP; MARTH, 1998). Sabe-se que a exposição de peixes aos hidrocarbonetos do petróleo, podem causar lesões histopatológicas em diversos órgãos (HSU; DENG, 1996; LEE; PAGE, 1997; BRAND et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008).

A maior taxa de danos encontrada durante o inverno no ponto P3, em comparação com o mesmo ponto durante o verão, pode estar relacionada ao somatório de estresse metabólico, gerado tanto pelas atividades antrópicas, como a naturalmente causada pela rigorosidade da estação fria. Segundo Meyer (1990, p. 45), temperaturas baixas, podem ser um exemplo de um estresse ambiental que pode não ser reconhecido, justamente por não ser seguido de significativa mortalidade. Algumas vezes, temperaturas baixas na água, podem significar a redução da resistência de peixes a patógenos e poluentes, por exemplo.

O ponto P3 é o trecho urbano do rio correspondente ao Parque Ecológico Municipal Jirau Alto, uma Unidade de Conservação criada pelo Decreto Municipal nº 3400 de agosto de 1997. Este parque é uma das áreas de preservação e lazer no município de Dois Vizinhos. Surgiu de uma proposta de preservação ambiental dentro do perímetro urbano municipal. Possui uma área total de 415.840,15 m<sup>2</sup>, e está situado na longitude de 53°04'30''S e latitude de 25°44'30''S. Na época de sua criação, a previsão de gastos para seu projeto de manejo foi orçada em um milhão e duzentos mil dólares. Em suas margens, é possível notar extensiva pavimentação, com estradas cortando o parque. Seu espaço também é ocupado por população de baixa renda, e pela exploração de basalto para pavimentação. Além disso, a maior parte do território do parque (96,63%) são de propriedades particulares (DOIS VIZINHOS, 1997). Estas características mostram uma situação de abandono e descaso por parte da população e sobre tudo do poder público responsável pela gestão do Parque. Isso sugere que a sua criação enquanto Unidade de Conservação Municipal, foi meramente um meio de conseguir a inclusão do município no cadastro de ICMS Ecológico.

A similaridade entre o ponto P4 e o ponto controle, pode estar relacionada ao isolamento deste ponto com relação aos demais, bem como a proximidade deste ponto com a foz de outro rio, onde a carga de poluentes é supostamente mais diluída, apresentando assim exemplares da espécie bioindicadora com condições de saúde relativamente melhores.



Embora a histologia seja uma importante ferramenta na avaliação de impacto ambiental, esta, não é um método específico para determinar a fonte da contaminação. As histopatologias não especificam a causa pontual da lesão, mas sim a resposta biológica cumulativa ao estresse. Entretanto, este método quando associados a outras análises, auxiliam na visualização de determinadas situações problema (LINS et al., 2010). Neste sentido, a análise de coliformes termotolerantes vem contribuir como indicativo da contaminação por esgoto doméstico e oriundos da agropecuária, podendo também evidenciar a deposição de material de origem fecal.

## 5.2 Coliformes Termotolerantes

Os resultados da determinação de coliformes termotolerantes, para todos os pontos de coleta, ficaram dentro do estabelecida pela resolução 357/2005 do CONAMA. Esta norma estabelece o limite de 1000 coliformes para rios de classe dois, em até 80% de pelo menos 6 amostras (CONAMA, 2005). Porém, em pelo menos um dos meses analisados, todos os pontos de coleta ultrapassaram os limites estabelecidos em lei para rios de classe 2, conforme apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Número Mais Provável de coliformes termotolerantes (NMP/100 mL), para as diferentes datas de coleta e pontos amostrais do rio Jirau Alto, Dois Vizinhos, PR.

PONTOS	01/12/2016	25/01/2017	15/02/2017	31/03/2017	13/04/2017	13/05/2017
P1	330	330	3500*	700	790	790
P2	220	170	700	1100*	490	340
P3	110	340	≥3500*	2800*	2800*	1300*
P4	340	340	≥3500*	490	2200*	2200*

\*: Valores superiores aos limites estabelecidos em lei para rios de classe 2 (1000NMP/100ml); (≥) valores que foram iguais ou superiores ao limite do método de análise empregado.

De modo geral, houve uma grande variação nos valores de NMP entre os meses e pontos estudados. Os valores variaram de 110 NMP/100mL em 01/12/2016 no ponto P3 a valores que ultrapassam 3500 NMP/100mL nos pontos P3 e P4 em 15/02/2017. O ponto P3, foi o local que ultrapassou o limite de 1000NMP/100mL pelo maior número de meses consecutivos (fevereiro, março, abril e maio), sendo seguido pelo ponto P4 (fevereiro, abril, maio). Essa elevada densidade de crescimento bacteriano para os pontos de maior influência

urbana (P3 e P4), pode ser explicada pela existência de muitas residências com emissão de esgoto direta, ou a proximidade destas como o rio, recebendo também descargas de poluentes industriais e dejetos de animais de criação nestes trechos.

Muitos estudos mostram que, quanto mais urbanizado o entorno de um rio, maiores são as chances da contaminação da água por esgoto. Um exemplo é o trabalho de George et al., (2001), que avaliou a qualidade do rio Senna na França, utilizando-se das bactérias do grupo coliforme como indicador de poluição. Ao analisar um trecho de 450 km do rio, constatou que os mais elevados índices de coliformes termotolerantes se encontravam dentro de zonas urbanas, como na cidade de Paris. O resultado deste estudo mostrou o grande impacto nos trechos urbanos deste rio, como a abundância de bactérias e turbidez, fatores estes também observados no rio Jirau Alto.

Uma vez detectados elevados valores de NMP, aumenta-se a possibilidade da existência de micro-organismos patogênicos na água. Estes patógenos, podem ser responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica, tais como febre tifoide, febre paratifoide, disenteria bacilar e cólera (JULIÃO, 2003). É importante salientar que a contaminação da água pode ocasionar não apenas a transmissão de várias doenças via contato e consumo (NEILL, 2004), mas também o aumento de custos com saúde pública, tratamento e abastecimento de água (CROWTHER; KAY; WYER, 2001).

Na região de nascente do rio Jirau Alto, obteve-se um crescimento bacteriano menor que nos demais pontos. Isso pode ser atribuído a proteção proporcionada pela mata ciliar existente junto ao rio, que mesmo estreita, ainda parece surtir algum efeito. Outro importante fator, se deve ao relativo isolamento, com poucas residências nas proximidades. A localização do P1, numa área menos habitada, contribui com a diminuição dos riscos da deposição de dejetos e lixos no local.

Embora os pontos P1 e P2 possuam os menores valores de contaminação por coliformes no período, estes locais também estão localizados em meio a várias propriedades rurais de pequeno porte, onde a pecuária constitui uma das principais atividades econômicas na região. O acesso direto destes animais ao rio, pode ocasionar na liberação eventual de excrementos no corpo d'água, contribuindo para os elevados valores verificados em 15/02/2017 para P1 e 31/03/2017 para P2. Este resultado, onde os referidos pontos de coleta ultrapassaram o limite de 1000 coliformes termotolerantes, já tornaria a água imprópria para o banho, bem como para dessedentação de animais (contato secundário) nos referidos meses. É importante destacar que a portaria N°20/92 da SUREHMA (atualmente IAP – Instituto Ambiental do Paraná), enquadra a região correspondente ao P1, como águas pertencentes a

classe 1 (SUREHMA, 1992). Os valores de coliformes para rios de classe 1, não devem ultrapassar o limite de 200NMP/100mL (CONAMA, 2005), limite este muito inferior ao encontrado no referido local, ao longo de todos os meses analisados.

A portaria Nº20 de 20/9/1992 do SUREHMA era uma autarquia responsável por enquadrar os cursos d'água da bacia do Rio Iguaçu. Segundo esta portaria, todos os cursos d'água da Bacia do Rio Iguaçu, de domínio do Estado do Paraná, pertencem à classe 2. A mesma portaria, porém, estabelece que aqueles rios utilizados para abastecimento público pertencem a classe 1, desde sua nascente até a captação, quando a área total da bacia de captação não exceder a 50 (cinquenta) quilômetros quadrados. Dentre a relação dos rios listados por esta portaria, se encontra o Rio Jirau Alto (SUREHMA, 1992).

O rio Jirau Alto tem grande importância para o município de Dois Vizinhos. Parte do seu trecho está em perímetro urbano, passando por diversas residências, gerando alagamentos nos períodos mais chuvosos. Este rio é a principal fonte de abastecimento público do município. A unidade da SANEPAR, responsável por utilizar a água deste manancial para abastecimento público, atendia 9.991 residências, 1.045 unidades de comércio, 58 unidades de utilização industrial, além de 137 unidades de utilidade públicas, totalizando, no ano de 2014, atendimento a 11.231 unidades. O consumo de água, segundo volume anual faturado, variou em torno dos 1.722.731m<sup>3</sup> em 2012 (BEAL; FERREIRA; RAUBER, 2014). Além disso, em sua área rural, a água deste rio também é utilizada para dessedentação de animais de criação, onde 125 propriedades rurais pertencem a sua bacia de captação (PIGOSSO, 2009).

Do ponto de vista temporal, o mês de fevereiro, apresentou os maiores valores de NMP. Isso pode ser explicado pela maior pluviosidade ocorrida neste mês, onde o escoamento superficial da água pode contribuir para o carreamento de resíduos para o rio, como deposição de materiais de origem fecal. Com exceção do ponto P2, todos os demais pontos, neste mês, ultrapassaram os valores estabelecidos para águas de classe 2, estando também em desacordo com o estabelecido para águas de classe 3. Nesta classe, o limite de 2500NMP/100mL não deve ser excedido, valor este ultrapassado pelas amostras de P1, P3 e P4 do referido mês. As águas doces que possuem este enquadramento, são águas de menor qualidade, cujo uso é permitido para apenas algumas finalidades restritas, como pesca, navegação, recreação e contato secundário (CONAMA, 2005). Estes resultados demonstram uma correspondência entre as concentrações mais elevadas de coliformes e o mês correspondente ao período chuvoso (ASHTON, 1985). Segundo Jeng et al. (2004), boa parte da degradação dos rios e outros ambientes aquáticos junto a áreas urbanas, está também relacionada as precipitações que, ao lavar a superfície, carregam todos os tipos de poluentes para os corpos d'água.

A mata ciliar, ao longo do trecho urbano do rio, se encontra bastante descontínua, estando ausente em diversos locais. Os processos erosivos tendem a acelerar, uma vez que o solo se encontra desprotegido da precipitação de chuvas, levando a sua rápida saturação (CARNEIRO et al., 2001). Este fator somado a intensa impermeabilização do solo nas áreas urbanas do rio, contribuem para aumentar a entrada de poluentes por meio de escoamento superficial.

Segundo Bezerra (2008, p. 30), este problema também é acentuado pelo modelo econômico existente nos espaços urbanos, que muitas vezes não apresentam plano de manejo efetivo de ocupação do solo. A legislação ambiental, por outro lado, acaba deixando de lado, sob vários aspectos, as demandas sociais e econômicas da população urbana, como a demanda habitacional de populações carentes, bem como sua infraestrutura, que por vezes se mostra precária. Essa situação cria uma disparidade entre o contexto pensado pelas leis ambientais e as reais demandas de uso e ocupação do espaço urbano (BEZERRA, 2008). O rio Jirau Alto não é exceção a esta prática de ocupação do solo, em vários trechos ao longo do curso urbano do rio, (P3 e P4) é possível observar residências subnormais as suas margens, não conectadas a rede de esgoto, com encanamentos expostos e direcionados para o rio.

As residências subnormais, são uma condição onde o crescimento urbano não é acompanhado pelo desenvolvimento urbano. Neste processo, parte da população carente viabiliza acesso a habitação através da autoconstrução de moradias e da ocupação de terras (por vezes na situação de invasão), o que acaba gerando construções insalubres. Assim, o crescimento urbano desordenado, somado as diferenças econômicas e sociais, gera a carência de infraestrutura urbana básica, tal como o saneamento básico (CARDOSO, 2016).

O esgoto doméstico ou domiciliar é essencialmente composto de água de banho, dejetos, papel, restos alimentares e águas de lavagem com extensa gama de produtos de limpeza. Desta complexa mistura, cerca de 70% dos sólidos constituem a matéria orgânica na forma de proteínas, carboidratos, óleos e gorduras. Uma vez utilizado para desinfecção microbiológica das águas, o cloro, empregado no processo de cloração, apresenta grande potencial para dar origem a compostos organoclorados, ao reagir com as substâncias orgânicas do esgoto (PEREIRA, 2006). É importante salientar que nem todos os microorganismos encontrados no grupo dos coliforme termotolerantes são de origem exclusivamente fecal. Tendo em vista que sua contagem é sempre maior que a observada para *E. coli*, levando-se em conta as mesmas amostras, seu uso como indicador de contaminação fecal, pode superestimar o grau de contaminação de uma amostra. A contagem de *E. coli* para análise de amostras de água se mostra, portanto, mais representativa (MARQUEZI, 2010).

Diante disso, fica a sugestão para análises futuras, quanto ao emprego deste parâmetro no rio estudado, além da análise de parâmetros físico-químicos da água, bem como aplicação de outros biomarcadores.

## 7 CONCLUSÃO

Os animais bioindicadores coletados em P3, tanto no inverno quanto no verão, apresentaram os maiores índices de danos histopatológicos, bem como foram detectados os maiores valores de coliformes neste local. Este resultado pode ser relacionado a escassez de mata ciliar, que facilita a entrada de poluentes no corpo aquático. Este fator também pode ser relacionado a esgotos clandestinos, juntamente com a extensiva pavimentação as margens do rio no trecho urbano. A situação também é agravada pelas pressões socioeconômicas e imobiliárias no entorno do Parque Ecológico Municipal do Rio Jirau Alto.

Embora os resultados indiquem que os valores de Coliformes Termotolerantes tenham ficado dentro dos limites prescritos em lei, para rios de classe 2, a água do rio Jirau Alto revelou-se imprópria para dessedentação de animais e balneabilidade em todos os pontos, durante a maior parte dos meses monitorados. Os valores apontam para duas principais fontes poluidoras. A primeira é o desmatamento para exploração agropecuária, que se estende até às margens do rio nos pontos P1 e P2, contribuindo para a deposição de material de origem fecal. A segunda é o lançamento clandestino de esgoto doméstico, provável responsável pelos elevados valores de coliformes encontrados sobretudo nos pontos de maior influência urbana.

A histologia é uma importante ferramenta na avaliação de impacto ambiental. Embora este método não especifique a causa pontual da lesão, quando associados a outras análises, como a determinação de coliformes termotolerantes, mostra-se muito útil como indicativo da contaminação ambiental.

Os trabalhos de biomonitoramento se mostram essenciais na prevenção contra danos à saúde humana e ambiental, bem como prejuízos econômicos em razão da má gestão e conservação dos recursos hídricos e suas florestas.

A má conservação de um rio de abastecimento mostra-se paradoxal a saúde humana, a medida em que o crescimento populacional aumenta a demanda por recursos naturais, principalmente por água de qualidade e em quantidade suficiente. Sendo assim, investigar e monitorar a origem, o mecanismo de ação e as consequências quanto a presença de contaminantes em águas públicas caracteriza-se em uma atividade básica no quesito saúde pública e conservação ambiental

## REFERENCIAS

AGBOHESSI, P. T. et al. Pesticides used in cotton production affect reproductive development, endocrine regulation, liver status and offspring fitness in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 167, p. 157–172, 2015.

APHA. **Standard Methods for the Examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: American Public Health Association, 1998.

VASANTHI, A. L. et al. Integrated use of histological and ultrastructural biomarkers in *Mugil cephalus* for assessing heavy metal pollution in Ennore estuary, Chennai. **Chemosphere**, v. 91, n. 8, p. 1156–1164, 2013.

ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n. 3–4, p. 199–235, 2007.

ASHTON. P. J. Seasonality in southern hemisphere freshwater phytoplankton assemblages. **Hydrobiologia**, v. 125, p. 179-190, 1985.

BATISTA, B. G.; FUCKIS, M. B Avaliação microbiológica da água do Arroio Pessegueirinho de Santa Rosa, noroeste do estado do Rio Grande do Sul. **Monografias Ambientais**, v. 9, n. 9, p. 2031-2037, 2012.

BEAL, D. A.; FERREIRA, Suzane Cordeiro; RAUBER, Denise. Recursos Hídricos: uso de água na indústria - o caso de Dois Vizinhos no Paraná-PR. In: **Congresso Nacional de Pesquisa em Ciências Sociais Aplicadas (III CONAPE)**. p. 6. 2014.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25–34, 1999.

BEZERRA, D. da S. **The mangrove ecosystem in the Urban Environment Context of Public Policy for Use and Occupation Solo River Basin Anil, São Luis, Maranhão**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em SAÚDE E MEIO AMBIENTE) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/1077/1/DENILSON%20DA%20SILVA%20BEZERRA.pdf>. Acesso em: 13/10/2017.

BORJA, A.; RANASINGHE, A.; WEISBERG, S. B. Assessing ecological integrity in marine waters, using multiple indices and ecosystem components: Challenges for the future. **Marine Pollution Bulletin**, p. 1–4, 2009.

BRASIL. **Sistema Nacional de Unidades de Conservação SNUC, Presidência da República do Brasil**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/sistema-nacional-de-ucs-snuc>>. Acesso em: 8 maio. 2017.

BUCKER, A. et al. Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 1, 2012.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 465–473, 2003.

CARDOSO, A. L. Assentamentos precários no Brasil: discutindo conceitos. **Cadernos do CEAS: Revista crítica de humanidades**, n. 230, p. 25-39, 2016. Disponível em: <<https://cadernosdoceas.ucs.br/index.php/cadernosdoceas/article/view/102>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1443-1452, 2001.

CARSON, R. **Silent Spring**. [s.l.] Houghton Mifflin Company; Anniversary edition (October 22, 2002), 1962.

BRASIL, Lei. Resolução CONAMA nº. 001: de 23 de janeiro de 1986. **Publicado no DOU**, 1986.

CONAMA. Resolução n 357, 18 de março de 2005. **Diário Oficial**, n. 53, p. 58–63, 2005.

CROWTHER, J.; KAY, D.; WYER, M. D. Relationships between microbial water quality and environmental conditions in coastal recreational waters: the Fylde coast, UK. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4029-4038, 2001.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). **Invertebrates Ecotoxicology** (London, England), v. 3, n. 3, p. 161–172, 1994.

DOIS VIZINHOS (Município). Decreto nº 3400, de Agosto de 1997. Estabelece a criação do Parque Ecológico Municipal de Dois Vizinhos e seu plano de manejo. **Prefeitura Municipal de Dois Vizinhos**. Dois Vizinhos, 1997.



DOYLE, M. P.; ERICKSON, M. C. The fecal coliform assay , the results of which have led to numerous misinterpretations over the years , may have outlived its usefulness. **Microbe**, n. April, 2006.

FOCHTMAN, P.; RASZKA, A.; NIERZEDSKA, E. The use of conventional bioassays, microbiotests, and some rapid methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. **Environmental Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 376–384, 2000.  
FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2003.

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**, v. 22, n. 17, p. 13263–13277, 2015.

FRENZILLI, G. et al. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. Mutation Research - **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1–2, p. 187–195, 2004.

GALVANI, E. **Unidades Climáticas Brasileiras**. Disponível em: <[http://www.geografia.fflch.usp.br/graduacao/apoio/Apoio/Apoio\\_Emerson/Unidades\\_Climaticas\\_Brasileiras.pdf](http://www.geografia.fflch.usp.br/graduacao/apoio/Apoio/Apoio_Emerson/Unidades_Climaticas_Brasileiras.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2016.

GEORGE, I. et al. Use of rapid enzymatic assays to study the distribution of faecal coliforms in the Seine river (France). **Water Science and Technology**, v. 43, n. 12, p. 77-80, 2001.

GHSI, N. C. et al. Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapo River, southern Brazil. **Chemosphere**, v. 161, p. 69–79, 2016.

GHSI, N. D. C. **Aplicação de múltiplos biomarcadores em peixe neotropical para avaliação da contaminação aquática em áreas de influência agrícola e urbana**. 2013. 58 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

GHSI, 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.

GOULART, M. D.; CALLISTO, Marcos. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, n. 1, p. 153-164, 2003.

GRISOLIA, C. K. Micronuclei monitoring of the from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, v. 491, p. 39–44, 2001.

HÄFELI, N.; SCHWARTZ, P.; BURKHARDT-HOLM, P. Embryotoxic and genotoxic potential of sewage system biofilm and river sediment in the catchment area of a sewage treatment plant in Switzerland. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1271–1279, 2011.

KRÜGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. **Centro Universitário Feevale**, v. 58, 2009.

KURTOVIĆ, B., VARDIĆ, I., VALIĆ, D., KAPETANOVIĆ, D., TESKEREDŽIĆ, Z., TESKEREDŽIĆ, E. Health status of chub (*Squalius cephalus*) in relation to water quality of Sava River. **Croat. J. Fish.**, v. 67, p. 63–75, 2009.

LAYRARGUES, P. P. Educação para a gestão ambiental: a cidadania no enfrentamento político dos conflitos socioambientais. **Sociedade e meio ambiente: a educação ambiental em debate**. São Paulo: Cortez, p. 87-155, 2000.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 2. ed. Edição-Campinas: Átomo, São Paulo, 2008.

LINS, J. A. P. N. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 8, n. 4, 2017.

MACHADO, A. A. DE S. et al. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. **Marine Environmental Research**, v. 98, p. 96–105, 2014.

MARQUEZI, M. C. Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

MARQUEZI, M. C. **Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de água**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MCCARTHY, J.F., HALBROOK, R.S., SHUGART, L. R. Conceptual Strategy for Design, Implementation , and Validation of a Biomarker-Based Biomonitoring Capability. **Environmental Protection**, n. 37, p. 96, 1991.

MELA, M. et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13–21, 2013.

MEYER, F. P.; BARCLAY, L. A. Field Manual for the Investigation of Fish Kills. Belo Horizonte: Cemig. **Editora e Gráfica Sigma**, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS no 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 2011.

MORENO, P.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do Rio das Velhas (MG). **Bioindicadores de qualidade da água. Jaguariúna: Embrapa**, p. 95-116, 2004.

NEILL, M. Microbiological Indices for total coliform and E. coli bacteria in estuarine waters. **Marine Pollution Bulletin**, n. 49, p. 752–760, 2004.

NEMR, A. E.; ABD-ALLAH, A. M. A. Organochlorine contamination in some marketable fish in Egypt. **Chemosphere**, v. 54, n. 10, p. 1401-1406, 2004.

N NETTO, G. F. et al. Impactos socioambientais na situação de saúde da população brasileira: Estudo de indicadores relacionados ao saneamento ambiental inadequado. **Tempus. Actas em Saúde Coletiva**, v. 4, n. 4, p. 53-71, 2009.

NWANI, C. D. et al. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 539–547, 2013.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: A review. Mutation Research - **Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 109–149, 2004.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. et al. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 53-69, 2005.

PANDEY, S. et al. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 1, p. 56–61, 2006.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2a ed. Vol. I, Goiânia: CEGRAF-UFG, 2005 624p.

PEREIRA, L. C. O. **A utilização do reativo de Fenton na desinfecção de esgotos domésticos com fins de reuso na irrigação de culturas**. 2006. 124f. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestre em Engenharia Ambiental)-Depto de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PEREIRA, S. et al. Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 157–166, 2013.

PIGOSSO, M. et al. DIAGNÓSTICO AMBIENTAL DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO JIRAU ALTO–DOIS VIZINHOS-PARANÁ. **Geoambiente On-line**, n. 13, p. 01-20 pág., 2009.

PILTAN, F. et al. Design Sliding Mode Controller for Robot Manipulator with Artificial Tuneable Gain. **Canadian Journal of pure and applied science**, v. 5, n. 2, p. 1573-1579, 2011.

PREFEITURA MUNICIPAL DE DOIS VIZINHOS: Site oficial da Prefeitura Municipal de Dois Vizinhos. Disponível em: <<http://doisvizinhos.pr.gov.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental design and data analysis for biologists**. Cambridge University Press, 2002.

RABITTO, I. DA S. et al. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 56–65, 2011.

RAMSDORF, W. A. et al. Handling of *Astyanax* sp. For biomonitoring in Canguiri farm within a fountainhead (Iraí River environment preservation area) through the use of genetic

biomarkers. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 10, p. 5841–5849, 2012.

RIBEIRO, ELOISA A. **Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (Benzeno, Tolueno E Xileno) no peixe *Sphaeroides testudineus* (LINNAEUS, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos.** 2007. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2007. Disponível em: <http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13541/TESE?sequence=1> Acesso em: 13/11/2017.

ROUND, F. E. Diatoms in river water-monitoring studies. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, n. 2, p. 129–145, 1991.

SANTOS, D.; HENRIQUE, C. Avaliação da qualidade da água de escolas do interior do município de cruz alta. **Exatas & Engenharia**, v. 5, n. 11, 2007.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75–86, 1997.

SILVA, M. F. **Análise histopatológica de fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas ao herbicida 2,4-D comercial.** 2015. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/139015>>.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. vol. 69, p.112-120 , 2008.

STENTIFORD, G. D. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137–159, 2003.

STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 53, n. 2, p. 293–304, 2002.

SUREHMA. Portaria N°020 de 12 de maio de 1992. Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Conselho. estadual dos Recursos hídricos. Disponível em:

<http://www.recursohidricos.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=29> Acesso em: 11/10/2017.

TEJEDA-VERA, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, E.; SEDEÑO-DÍAZ, J. E. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. **Environment International**, v. 33, n. 4, p. 521–531, 2007.

TRIEBSKORN, R. et al. Monitoring pollution in River Mure??, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 141, n. 1–3, p. 177–188, 2008.

TRUJILLO-JIMÉNEZ, Patricia 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.

VARÓ, I. et al. Toxicity and bioconcentration of Chlorpyrifos in aquatic organism: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 5, p. 623-630, 2000.

VINAY, S. B. et al. Bacterial indicators of faecal contamination of the Gangetic river system right at its source. **Ecological Indicators**, v. 5, p. 49–56, 2005.

WALDMAN, E. A.; MONTEIRO, C. A. Trajetória das Doenças Infecciosas: da Eliminação da Poliomielite à Reintrodução da Cólera. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 3, p. 5–47, 1999.

WHITFIELD, A. K.; ELLIOTT, M. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. A, p. 229–250, 2002.

ZHOU, Q. et al. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, 2008.