

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALICIANE DE ALMEIDA ROQUE

**MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM CASCUDO NEOTROPICAL
PARA AVALIAR A CONTAMINAÇÃO DO RIO PIRAPÓ, REGIÃO
NORTE DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2015

ALICIANE DE ALMEIDA ROQUE

**MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM CASCUDO NEOTROPICAL
PARA AVALIAR A CONTAMINAÇÃO DO RIO PIRAPÓ, REGIÃO
NORTE DO PARANÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Ciências Biológicas – Licenciatura da UTFPR - DV, como requisito parcial para obtenção do título de bióloga.

Orientador: Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira

Co-orientador (a): Profa. Dra. Nédia de Castilhos Ghisi.

DOIS VIZINHOS

2015

R786m Roque, Aliciane de Almeida
Múltiplos biomarcadores em cascudo neotropical para avaliar a contaminação do Rio Pirapó, região norte do Paraná. / Aliciane de Almeida Roque – Dois Vizinhos: [s.n], 2015.
40 f.:il.

Orientador: Elton Celton de Oliveira.
Co-orientador: Nédia de Castilhos Ghisi.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Ciências Biológicas. Dois Vizinhos, 2015.
Bibliografia p.37-40

1.Monitoramento ambiental. 2.Água - Poluição.
3.Peixes. I.Oliveira, Elton Celton, orient. II.Ghisi, Nédia de Castilhos, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Dois Vizinhos. IIII.Título

CDD: 570

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos

A memória de meu avô João Francisco Roque, um grande homem amável para com as pessoas e animais cujo amor pela vida despertou em mim o desejo de cursar biologia.

A minha mãe Maria Nunciação Roque e a minha irmã Adriana de Almeida Roque, minhas maiores incentivadoras.

Ao meu amor Alexandre Christiano de Oliveira pelo apoio e compreensão.

Aos meus orientadores Elton Celton de Oliveira e Nédia de Castilhos Ghisi por todo incentivo e ensinamentos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido o dom a vida.

A todos que de uma forma ou de outra me ajudaram durante meu período de graduação em Ciências Biológicas, tais como familiares, amigos, colegas, corpo docente e funcionários em geral da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos.

Agradecimento em especial ao meu professor e orientador Elton Celton de Oliveira por todos os ensinamentos repassados durante esta etapa, pelo apoio e confiança, dando-me a oportunidade da realização de iniciação científica que é tão importante para o aprendizado e enriquecimento curricular para quem pretende seguir carreira acadêmica.

A minha também professora e co-orientadora Nédia de Castilhos Ghisi por dividir parte de sua experiência e toda paciência durante esta etapa de aprendizado, além do grande incentivo a continuação de meus estudos.

Ao professor Fernando Carlos Sousa por ter aceitado compor minha banca, pelas sugestões de melhoria e também ensinamentos durante o período de graduação.

Aos professores das disciplinas de TCC 1 e 2, Gustavo Sene Silva e Fernanda Ferrari pelo auxílio às correções deste trabalho.

As minhas amigas e colegas de turma ao longo destes quatro anos Adrieli, Emellyn, Fernanda, Jheniffer, Poliana e Rebeca por terem tornado esta etapa de minha vida mais prazerosa, ao passo que já sinto saudades.

Isto é biologia: a ciência do mundo vivo (MAYR, Ernest, 2008).

RESUMO

ROQUE, Aliciane de Almeida. Múltiplos biomarcadores em cascudo neotropical para avaliar a contaminação do rio Pirapó, região norte do Paraná. 2015. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

O presente trabalho objetivou avaliar a contaminação do rio Pirapó, região norte do Paraná, a partir da utilização de múltiplos biomarcadores no peixe-cascudo *Hypostomus ancistroides*. As coletas do bioindicador foram realizadas em três pontos amostrais e em duas estações do ano, inverno e verão. Os pontos amostrais foram estabelecidos ao longo de um gradiente de poluição: 1- montante: localizado em Apucarana nas cabeceiras do rio, sendo o local mais preservado e com boa cobertura vegetal; 2- intermediário: após a estação de tratamento de água da cidade de Maringá, com atividade agropecuária e industrial e pouca cobertura da vegetação ciliar; 3- jusante: situado após a descarga dos resíduos oriundos da estação de tratamento de esgoto (ETE) de Maringá, com pouca cobertura vegetal. Os organismos coletados foram primeiramente anestesiados com cloridrato de benzocaína a 20%, mensurados quanto ao comprimento e peso total e, posteriormente, seccionados para retirada de tecidos-álvos, os quais foram fixados em ALFAC por 12 horas e, acondicionados em álcool 70%. Utilizou-se as brônquias e os fígados para análise das histopatologias, submetendo-os aos seguintes procedimentos histológicos de rotina: desidratação, inclusão, trimagem, microtomia e coloração com H/E. Após a confecção das lâminas, fez-se as análises qualitativas e quantitativas dos tecidos em microscopia de luz, buscando-se avaliar a extensão dos danos via índice de Bernet. O fator de condição alométrico (K), terceiro biomarcador utilizado neste estudo, foi estimado a partir dos dados morfométricos dos espécimes associado com o coeficiente angular (b) da relação peso-comprimento por ponto amostral. As variáveis dependentes aqui estudadas foram comparadas a partir de ANOVA bifatorial seguida pelo teste de Tukey, considerando os fatores: espacial e temporal. De maneira geral, os indivíduos dos pontos intermediário e jusante apresentaram significativamente os maiores índices histopatológicos e os menores valores de K. Conclui-se que os peixes destes pontos estiveram submetidos a um maior estresse antrópico, provavelmente devido à influência de micropoluentes dos efluentes industriais e urbanos observados naquela área.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Poluição aquática. Histopatologias. Fator de condição.

ABSTRACT

ROQUE, Aliciane de Almeida. Multiple biomarkers in neotropical catfish to assess the contamination of the Pirapó River, northern of Paraná State. 2015. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.

This study aimed to evaluate the contamination of the Pirapó River, northern of Paraná State, by the use of multiple biomarkers in catfish *Hypostomus ancistroides*. The bio-indicator was caught in three sampling points and two seasons, winter and summer. The sampling points were established along a pollution gradient: 1- Upstream: located in Apucarana city, near the headwaters of the river, the most preserved location and with good vegetation cover; 2- Intermediate: after the water treatment plant of Maringá city, with agricultural and industrial activity and scarce coverage of riparian vegetation; 3- Downstream: located after the discharge of waste from the sewage treatment plant (STP) of Maringá, with thin vegetation. The organisms collected were first anesthetized with benzocaine hydrochloride (20%), measured about length and total weight, and subsequently sectioned for removal of target tissues, which were fixed in ALFAC for 12 hours, and kept in 70% ethanol. We used the gills and livers to histopathological analysis. It's followed routine histological procedures: dehydration, trimming, microtome and stained with H/E. The stained slides were analyzed qualitative and quantitatively in light microscopy, using Bernet index. The allometric condition factor (K) was estimated from the morphometric data of specimens associated with the slope (b) the length-weight relationship for sample point. The dependent variables were compared from two-way ANOVA followed by Tukey test, considering two factors: spatial and temporal. In general, individuals located in downstream and intermediate points had significantly higher rates of histopathological damages and smaller K values. We concluded that individuals from these points have been subjected to a higher anthropogenic stress, probably due to influence of micropollutants observed urban and industrial effluents that area.

Keywords: Biomonitoring. Water pollution. Histopathology. Condition factor.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - EXEMPLAR DO BIOINDICADOR ESTUDADO, *Hypostomus ancistroides*, CAPTURADO NO RIO PIRAPÓ.....19
- FIGURA 2 - ÁREA DE COLETA NA BACIA DO RIO PIRAPÓ, REGIÃO NORTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL. *UPSTREAM*: PONTO A MONTANTE, A OESTE DE APUCARANA; *MIDDLE*: PONTO INTERMEDIÁRIO, A NORDESTE DE MARINGÁ; *DOWNSTREAM*: PONTO A JUSANTE, NORTE DE MARINGÁ.20
- FIGURA 3 - IMAGEM CAPTURADA NOS PONTOS AMOSTRAIS, REPRESENTANDO AS CONDIÇÕES DE COLETA; A: PONTO A MONTANTE, A OESTE DE APUCARANA; B: PONTO INTERMEDIÁRIO, A NORDESTE DE MARINGÁ; C: PONTO A JUSANTE, NORTE DE MARINGÁ.21
- FIGURA 4 - ETAPAS DO PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO. A: BLOCOS DE RESINA HISTOLÓGICA, TIPO PARAPLAST, INCLUÍDOS COM FRAGMENTOS DE TECIDO BRANQUIAL; B: BLOCOS TRIMADOS DE FÍGADO E PRONTOS PARA SEREM MICROTOMADOS; C E D: BATERIA DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS.....23
- FIGURA 5 - LÂMINAS HISTOLÓGICAS. A: SECAGEM DAS LÂMINAS APÓS SUA MONTAGEM COM A RESINA BÁLSAMO DO CANADÁ; B: ANÁLISE DAS LÂMINAS EM MICROSCOPIA DE LUZ.24
- FIGURA 6 - SECÇÕES DE TECIDO BRANQUIAL DE *H. ANCISTROIDES*. A. LAMELAS NORMAIS; B. ANEURISMAS; C. PARASITA; D. LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DE PARASITA; E. FUSÃO PARCIAL DE LAMELAS; F. FUSÃO TOTAL DE LAMELAS.27
- FIGURA 7 - SECÇÕES DE TECIDO HEPÁTICO DE *Hypostomus ancistroides*. A HEPATÓCITOS NORMAIS; B ADIPÓCITOS; C VACUOLIZAÇÃO CELULAR; D INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS. BARRA = 20µM.....29

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO DAS BRÂNQUIAS ENTRE OS TRÊS PONTOS AMOSTRAIS DO RIO PIRAPÓ-PR, CONSIDERANDO AS DUAS ESTAÇÕES DO ANO. LETRAS DIFERENTES (A, B E C) REPRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NO TESTE DE TUKEY ($P < 0,05$). AS BARRAS DE ERROS INDICAM O INTERVALO DE CONFIANÇA..... 28
- GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DOS ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS DE FÍGADO ENTRE OS TRÊS PONTOS AMOSTRAIS DO RIO PIRAPÓ. LETRAS DIFERENTES (A, B) REPRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NO TESTE DE TUKEY ($P < 0,05$). IC = INTERVALO DE CONFIANÇA.....30
- GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO FATOR DE CONDIÇÃO (K) ENTRE OS TRÊS PONTOS AMOSTRAIS DO RIO PIRAPÓ, CONSIDERANDO AS DUAS ESTAÇÕES DO ANO. LETRAS DIFERENTES (A, B, C, D, E) REPRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NO TESTE DE TUKEY ($P < 0,05$). IC = INTERVALO DE CONFIANÇA.....31

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - RESULTADO DO TESTE ANOVA BIFATORIAL PARA O ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO DAS BRÂNQUIAS, CONSIDERANDO OS FATORES LOCAL E ESTAÇÃO DO ANO. * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P < 0,05$); SS = SOMA DOS ERROS AO QUADRADO; G.L = GRAUS DE LIBERDADE; MS = MÉDIA DOS QUADRADOS; F = VALOR DO TESTE DE FISHER.....28
- TABELA 2 - TABELA 2 - RESULTADO DO TESTE ANOVA BIFATORIAL PARA O ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO DE FÍGADO, CONSIDERANDO OS FATORES LOCAL E ESTAÇÃO DO ANO. LEGENDA: * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P < 0,05$); SS = SOMA DOS ERROS AO QUADRADO; G.L = GRAUS DE LIBERDADE; MS = MÉDIA DOS QUADRADOS; F = VALOR DO TESTE DE FISHER30
- TABELA 3 - RESULTADO DO TESTE DE ANOVA BIFATORIAL PARA O FATOR DE CONDIÇÃO, CONSIDERANDO OS FATORES LOCAL E ESTAÇÃO DO ANO. LEGENDA: * VALORES SIGNIFICATIVOS ($P < 0,05$); SS = SOMA DOS ERROS AO QUADRADO; G.L = GRAUS DE LIBERDADE; MS = MÉDIA DOS QUADRADOS; F = VALOR DO TESTE DE FISHER31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO LITERÁRIA	14
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGIA	19
4.1 ESPÉCIE BIOINDICADORA	19
4.2 ÁREA DE ESTUDO	19
4.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL E PROTOCOLO HISTOLÓGICO	21
4.3.1 Protocolo histológico de fígado e brânquia	22
4.5 ANÁLISE DE DADOS.....	26
5 RESULTADOS	27
5.1 HISTOLOGIA DE BRÂNQUIA	27
5.2 HISTOLOGIA DE FÍGADO	29
6 DISCUSSÃO	32
7 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A expansão tecnológica e o crescimento demográfico humano têm elevado a deterioração dos recursos ambientais, ameaçando a qualidade de vida da população atual e das futuras gerações, em contramão às prerrogativas da sustentabilidade. Assim, surge a necessidade de uma conscientização ecológica para o desenvolvimento de hábitos que reduzam os efeitos negativos da antropização aliado a métodos para a detecção de impactos (FEIJÓ, 2008, p. 169).

A contaminação de ambientes aquáticos enquadra-se como um dos principais efeitos negativos ocasionados pela antropização. Segundo Ghisi (2012), os ecossistemas aquáticos podem ser considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente. Isto porque estão susceptíveis tanto a ação de contaminantes aéreos pela simples deposição atmosférica quanto a contaminantes terrestres advindos pelo escoamento da água das chuvas. Entre os poluentes que mais comumente acometem tais ambientes podem ser citados o influxo de metais pesados, hidrocarbonetos, pesticidas, detergentes, dentre outros componentes do esgoto urbano e da ocupação humana (GHISI, 2012).

Conforme Domingos (2006), a contaminação destes ecossistemas prejudica direta e/ou indiretamente os organismos aquáticos, afetando desde as suas relações tróficas, seu desempenho reprodutivo e sua sanidade em geral até os padrões de ciclagem de nutrientes e produtividade do ambiente em que vivem. Além disso, seus impactos também podem atingir a espécie humana, que depende destes ambientes, seja pelo consumo de água ou para se alimentar de organismos ali viventes. De acordo com Viarengo (1989), os seres vivos constantemente expostos a metais pesados e pesticidas tendem a bioacumular tais compostos, incorporando-os à cadeia alimentar e fazendo o seu repasse para os níveis tróficos seguintes.

Portanto, o monitoramento de ambientes aquáticos é fundamental para averiguação da qualidade da água destinada a biota e ao consumo da população humana, em geral. Para tanto, os peixes são bons bioindicadores nestes estudos, pois a entrada de xenobiontes provoca alterações no padrão normal do funcionamento de seu organismo. O termo bioindicador não deve ser confundido com biomarcador, uma vez que este último define-se como as respostas biológicas internas dos organismos expostos aos poluentes, tais como modificações na

fisiologia e estado nutricional dos indivíduos e na estrutura de tecidos, células, organelas e/ou moléculas. Os biomarcadores verificam o estado de saúde dos organismos e servem como sinais de alertas de contaminação ambiental (PAYNE et al., 1987).

Atualmente diversos biomarcadores são empregados no biomonitoramento. Para maior consistência das respostas dos efeitos negativos da contaminação ambiental sobre os organismos recomenda-se a correlação entre eles.

O fator de condição (K) está enquadrado entre os principais biomarcadores utilizados em estudos de biomonitoramento, o qual consiste em um parâmetro fisiológico que estima o grau de nutrição e bem-estar animal. Este parâmetro serve como ferramenta eficiente em avaliações de impactos mais tardios a nível de organismo (ARAÚJO; PEREIRA; FLYNN, 2011).

Outros tipos de biomarcadores amplamente empregados são os histopatológicos. Isto porque alguns animais, como peixes apresentam a característica de bioacumulação, ou seja, incorporam os poluentes dissolvidos do meio em tecidos-avulsos, especialmente no fígado e brânquias, de forma que análises nesses órgãos são eficientes refletoras sobre o estado de poluição ambiental a que estes organismos estão submetidos (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2005).

No presente estudo, o peixe-cascudo *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) foi utilizado como organismo alvo para avaliação do ambiente. Trata-se de uma espécie pertencente à família Loricariidae, ordem Siluriforme e infra-classe Teleostei (REIS; KULLANDER; FERRARI, 2003). Apresenta potencial econômico, sendo alvo da pesca e muito apreciada pelo consumo humano. Sua escolha como espécie bioindicadora foi dada em vista a sua abundância no rio Pirapó e por não ser migradora.

Desta maneira, este trabalho buscou avaliar as histopatologias em tecido hepático e branquial e o fator de condição alométrico (K) no peixe-cascudo *H. ancistroides* para monitorar a contaminação aquática do rio Pirapó, região norte do estado do Paraná, considerando um gradiente de poluição.

2 REVISÃO LITERÁRIA

A poluição de ambientes aquáticos pode ser ocasionada de forma natural ou antrópica. No primeiro caso, as elevadas descargas hídricas, por exemplo, contribuem com a entrada de material alóctone nos cursos d' água, acarretando em eutrofização, acidificação e diminuição dos níveis de oxigênio (ESTEVEZ, 2011, p. 120). No entanto, as comunidades biológicas conseguem se adaptar a estes eventos naturais, modulando seus componentes pelo processo evolutivo, fato que determina o seu poder de resiliência (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010, p. 357). As atividades antrópicas, por outro lado, agem como agravantes imprevisíveis para as comunidades e seus organismos, alterando a médio e longo prazo os processos vitais dos ecossistemas.

As frequentes descargas de resíduos industriais, agrícolas e domésticos estão entre as principais causas de poluição antrópica. A situação torna-se preocupante pelo fato dos poluentes apresentarem alta toxicidade e tendência de acumulação nos ecossistemas (MATASIN et al., 2011). O mau uso do solo, por exemplo, contribui para o incremento de poluentes nos cursos hídricos, uma vez que, segundo Calheiros, Oliveira e Dores (2006), procedimentos agrícolas inadequados levam a um excesso de aplicação de fertilizantes e pesticidas. Estes compostos juntamente com partículas do solo podem ser carregados com a água da chuva para dentro dos cursos de água e acarretar em contaminação aquática.

A entrada excessiva de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) altera a dinâmica físico-química e biológica dos ambientes aquáticos e provocam um processo chamado de eutrofização. A eutrofização resulta na proliferação excessiva de macrófitas, algas e bactérias aeróbias e anaeróbias na água, as quais reduzem os níveis de oxigênio (SMITH; SCHINDLER, 2009) e também podem adicionar substâncias tóxicas nocivas à saúde dos organismos (BARRETO et al., 2013). O resultado disso é a diminuição da qualidade ambiental (BRAGA et al., 2005) e aumento da mortalidade de peixes (SMITH; SCHINDLER, 2009). Os eventos de eutrofização podem ser naturais ou artificiais, sendo o último imprevisível quanto a frequência e intensidade e, portanto, de difícil absorção pelas comunidades bióticas.

Os pesticidas utilizados nas atividades agrícolas e os metais pesados oriundos da urbanização e industrialização elevam a poluição dos ambientes

aquáticos por promover a bioacumulação progressiva destes produtos ao longo da cadeia trófica, fato que pode causar alterações em processos fisiológicos dos animais que ali vivem, em função do aumento da concentração destas substâncias em seus tecidos, ou disfunções em seus sistemas (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010, p. 485). Tais substâncias químicas podem ser também chamadas de xenobiontes (xeno = estranho, bionte = vida).

O problema da bioacumulação, também conhecido por biomagnificação, foi inicialmente abordado em 1962 pela bióloga marinha norte-americana Rachel Carson, com a publicação do livro "Primavera Silenciosa". Embasada em estudos detalhados, a autora relatou os efeitos prejudiciais da introdução e o uso indiscriminado de defensivos agrícolas, mais especificamente sobre os perigos da pulverização com diclorodifeniltricloroetano (DDT) (CARSON, 1962). Este inseticida apresenta grande persistência no meio ambiente, sendo responsável por disfunções fisiológicas em diversos grupos animais, incluindo os seres humanos com aumento de neoplasias e de outras doenças graves (BRITO, 2011).

Atualmente, a maior parte da água potável distribuída pelas Estações de Tratamento de Água e das águas residuais oriundas das Estações de Tratamento de Esgoto brasileiras não recebem protocolos específicos para redução ou eliminação dos micropoluentes, tais como hormônios, metais e pesticidas (AMORIM, 2003), os quais acabam sendo incorporados no ambiente e, conseqüentemente, nos organismos. Assim, torna-se indispensável a realização do monitoramento da qualidade da água que está sendo destinada ao consumo da população em geral.

Um método eficiente para verificação de alterações em ambientes aquáticos é o emprego de bioindicadores. Conforme Arias et al. (2007) o termo bioindicador refere-se ao organismo do qual estão sendo extraídas as informações a respeito das condições ambientais do local em que o mesmo está inserido. No entanto, o termo bioindicador não deve ser confundido com biomarcador, pois o último refere-se a alterações internas ocorridas nos organismos expostos aos agentes xenobiontes, tais como modificações na estrutura de seus tecidos, células, organelas ou em nível molecular (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996).

Os peixes são reconhecidamente bons bioindicadores e amplamente utilizados no monitoramento dos ambientes aquáticos. O emprego destes organismos é viável por incluírem alta variedade de espécies e por representarem todos os níveis da cadeia trófica, exceto o de produtor. Além disso, o grupo

apresenta uma taxonomia bem definida, podem ser obtidos com certa facilidade, possibilitam o cultivo em unidades experimentais e, são apreciados e consumidos por humanos, o que denota sua importância econômica (BARBOUR et al., 1999).

Em peixes, os impactos podem ser mensurados por sinais tardios ou precoces. No primeiro, os parâmetros utilizados são em nível de comunidade ou população, enquanto no segundo os parâmetros são a nível tecidual, celular ou molecular. Estas respostas obtidas nos níveis mais inferiores de organização biológica são denominadas de biomarcadores e refletem com maior precisão efeitos antrópicos crônicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), os quais muitas vezes ainda não foram observados em hierarquias maiores.

Entre as formas utilizadas para a detecção de estresse animal está o emprego de técnicas histológicas, a nível tecidual. De acordo com Oliveira-Ribeiro et al. (2012) o uso da histopatologia como biomarcador para estudo do efeito de agentes químicos capazes de levar a danos teciduais e secundariamente fisiológicos, permite a determinação de danos primários e avaliação de suas consequências para as funções vitais dos organismos expostos, como crescimento e reprodução.

A histopatologia consiste em uma técnica eficiente e relativamente rápida, por isso se enquadra entre os principais métodos de detecção do nível dos efeitos tóxicos em órgãos e tecidos. Portanto as alterações histológicas em tecidos de peixes podem ser consideradas como excelentes ferramentas na detecção de efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2012). Ainda conforme o mesmo autor, a escolha do tecido-alvo dependerá do nível de interpretação pretendido. Outro quesito a ser considerado para a escolha do tecido é que os tipos de lesões são dependentes do tempo de exposição e da concentração do poluente, afetando os organismos de forma aguda a crônica.

Para vertebrados, o fígado é considerado um dos principais tecidos-alvo avaliados em monitoramentos, devido ao seu papel no funcionamento normal do organismo. Segundo Bernet et al. (1999) este órgão é fundamental ao metabolismo, para a excreção de xenobiontes e é também o local de produção da vitelogenina, que são precursoras das proteínas da gema dos ovos.

A análise de brânquias é também fundamental, por se tratar de um órgão que se mantém em contato direto com o meio externo, sendo constantemente exposta a ação de contaminantes que podem danificar sua estrutura e comprometer

suas múltiplas funções, tais como, trocas gasosas, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, excreção de compostos nitrogenados e gustação (ARELLANO; STORCH; SARASQUETE, 1999).

A quantificação do estado nutricional e do bem-estar animal se constitui em outro parâmetro ictiológico importante no estudo da influência de variações ambientais e antrópicas sobre os bioindicadores (WOOTTON, 1999). Neste sentido, a estimativa do fator de condição alométrico (K) tem se mostrado promissora para avaliar estes quesitos, sendo o principal modelo utilizado nos estudos de biomonitoramento. Em peixes, o valor de K é estimado a partir de dados morfométricos associados ao coeficiente angular (b) da relação peso-comprimento.

Os dados para elaboração deste trabalho foram obtidos do peixe-cascudo *Hypostomus ancistroides*, os quais foram coletados ao longo de um gradiente de poluição no rio Pirapó, em duas estações do ano. A bacia deste rio está localizada na região norte do estado do Paraná, tendo suas nascentes no município de Apucarana. Ao longo de sua extensão este rio sofre diversos efeitos da antropização, tais como áreas agropecuárias, muitas vezes sem vegetação ciliar, e grandes áreas urbanas, como a de Maringá e região metropolitana, com cerca de 500 mil habitantes e intensa atividade industrial (CUNICO et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta de múltiplos biomarcadores em *Hypostomus ancistroides* para inferir sobre a qualidade ambiental no rio Pirapó, região norte do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confeccionar lâminas histológicas de fígado e brânquia para cada indivíduo;
- Identificar os diferentes tipos de lesões nos tecidos hepático e branquial dos indivíduos;
- Estimar a extensão e o grau de comprometimento de cada tipo de lesão em cada tecido-alvo;
- Determinar o índice individual dos danos por tipo de tecido;
- Determinar a relação peso-comprimento para cada ponto amostral;
- Estimar o fator de condição para cada indivíduo;
- Comparar estatisticamente as taxas de danos histológicos e o fator de condição entre os pontos amostrais e estações do ano.

4 METODOLOGIA

4.1 ESPÉCIE BIOINDICADORA

A espécie de peixe bioindicadora (Figura 1) foi o cascudo *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911), devido a: 1- sua elevada frequência no rio Pirapó, o que possibilita um bom número amostral; 2- sua resistência a cativeiro, facilitando o transporte e o manuseio em laboratório; 3- características biológicas da espécie, uma vez que possui baixo poder de deslocamento, não realiza migrações reprodutivas e sua dieta é predominantemente detritívora (BONATO; ARAÚJO; DELARIVA, 2008).



Figura 1 - Exemplar do bioindicador estudado, *Hypostomus ancistroides*, capturado no rio Pirapó.

4.2 ÁREA DE ESTUDO

A Bacia hidrográfica do Pirapó possui uma área total de 5.098,10 km², influenciando direta e indiretamente uma população de aproximadamente 650.000 habitantes. O rio Pirapó nasce no município de Apucarana e escoar para o norte, percorrendo uma extensão de 168 km até sua foz no rio Paranapanema. Sua

demanda hídrica é de aproximadamente 3 mil L/s, dos quais 75% provém de mananciais superficiais e 25% de mananciais subterrâneos. Com relação aos setores usuários, 38% são destinados ao abastecimento público, 43% para uso industrial, 10% para o setor agrícola, 9% para o setor pecuário e 1% para o setor mineral. Grande parte da bacia é ocupada pela agricultura intensiva. Na região norte e central existem áreas de pastagens artificiais e campos naturais. Ao sul aparece a classe de uso misto e há uma concentração urbana e industrial na região de Maringá (PARANÁ, 2010).

Os pontos amostrais do presente trabalho foram distribuídos ao longo do rio Pirapó de acordo com o nível de interferência antrópica, buscando-se um gradiente de poluição (Figura 2).

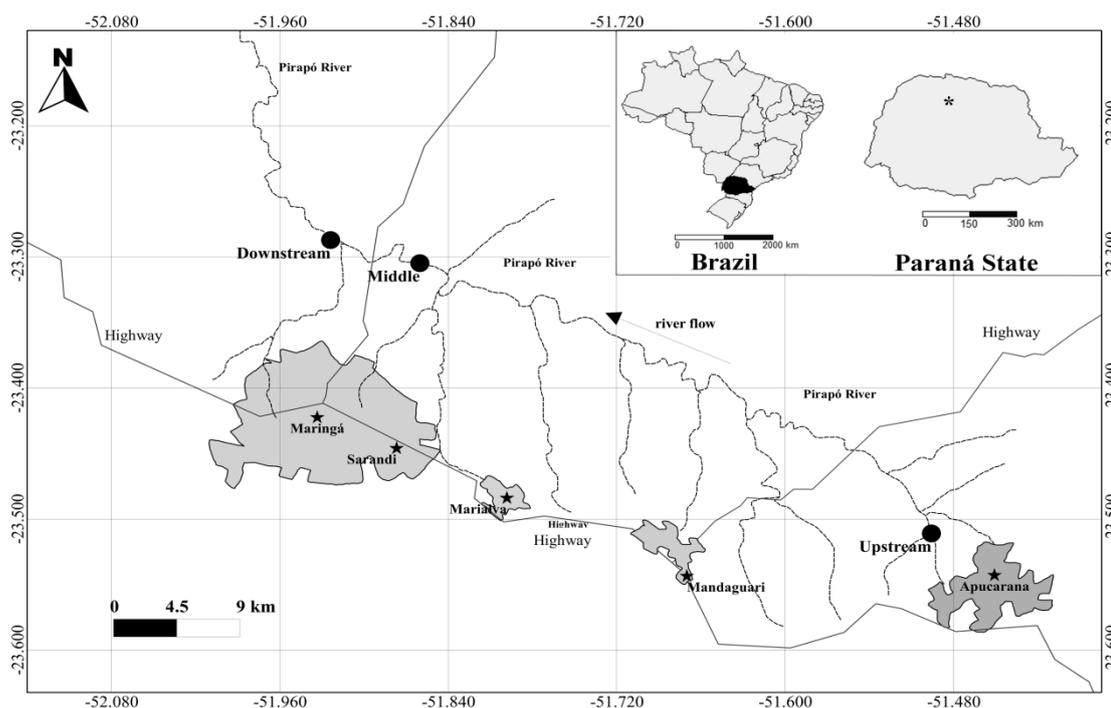


Figura 2 - Área de coleta na bacia do rio Pirapó, região norte do estado do Paraná, Brasil. *Upstream*: ponto a montante, a oeste de Apucarana; *Middle*: ponto intermediário, a nordeste de Maringá; *Downstream*: ponto a jusante, norte de Maringá.

Ponto Montante – localizado nas cabeceiras do rio Pirapó, em Apucarana, nas coordenadas latitude $23^{\circ}30'39,05''\text{S}$ e longitude $51^{\circ}29'44,55''\text{O}$, sendo o local mais preservado, com mata ciliar conservada e boa cobertura vegetal;

Ponto Intermediário – situado em Maringá, depois da captação de água para o abastecimento público nas coordenadas latitude $23^{\circ}18'16,86''\text{S}$ e longitude $51^{\circ}51'36,69''\text{O}$, caracterizado por intensa atividade agrícola e industrial e elevada degradação da vegetação ciliar;

Ponto Jusante – situado em Maringá, após o lançamento dos efluentes da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) nas coordenadas latitude $23^{\circ}17'13,42''\text{S}$ e longitude $51^{\circ}55'25,64''\text{O}$, tendo um provável acúmulo de influências antrópicas.

Os pontos amostrais possuem características distintas e as condições do local de coleta estão demonstradas na Figura 3.



Figura 3 - Imagem capturada nos pontos amostrais, representando as condições de coleta; A: ponto a montante, a oeste de Apucarana; B: ponto intermediário, a nordeste de Maringá; C: ponto a jusante, norte de Maringá.

4.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL E PROTOCOLO HISTOLÓGICO

Para a realização do presente trabalho foram efetuadas duas coletas de material biológico em cada um dos pontos amostrais anteriormente descritos, uma no verão (dezembro de 2012) e outra no inverno (julho de 2013), sendo em cada coleta capturado aproximadamente, 20 indivíduos de *H. ancistroides*.

Para captura dos indivíduos foi utilizado seis redes de espera, das quais quatro apresentavam 5 m de comprimento X 1,5 m de altura e malha de 1,5 cm entre nós opostos. As duas redes restantes apresentavam 10 m X 1,5 m e malha de 1,5 cm. Estas redes foram expostas paralelamente às margens por um período variável, de acordo com o número de indivíduos capturados. As redes eram vistoriadas periodicamente até a coleta de aproximadamente 20 exemplares.

Os indivíduos capturados foram acomodados em recipiente de poliestireno, de 40 litros, com aerador, buscando mantê-los vivos, onde foram transportados até o laboratório para o procedimento de triagem.

Em laboratório, fez-se a identificação adequada dos indivíduos (GRAÇA; PAVANELLI, 2007), os quais em seguida foram enumerados de acordo com o ponto amostral e a estação do ano.

Logo após, os espécimes foram anestesiados com cloridrato de benzocaína a 20% e tiveram seus dados morfométricos tomados quanto ao comprimento total (Ct), em centímetros, e peso total (Pt), em gramas.

Na sequência procedeu-se a retirada dos tecidos para o estudo das histopatologias. Fragmentos de brânquia e fígado foram acondicionados em frascos, devidamente etiquetados, fixados em ALFAC (80% álcool, 15% formol e 5% ácido acético) por 12 horas e, posteriormente, acondicionados em álcool 70% para serem processados pelo protocolo histológico de rotina.

4.3.1 Protocolo histológico de fígado e brânquia

Os fragmentos de fígado e de brânquia foram desidratados em uma série crescente de alcoóis (1 hora em cada álcool: 80%, 90%, 95% e 100%) até a sua diafanização (clareamento e desidratação das amostras) em xilol (de 20 a 60 min). Após, o material foi incluído no meio de incorporação de tecidos Paraplast, na fase líquida em estufa a 60°C, por 4 horas. Em seguida, o material foi alocado em temperatura ambiente até a solidificação da resina.

Posteriormente, o material retirado foi trimado e cortado em micrótomo, na espessura de 7 µm. Os cortes foram distendidos em lâmina sobre uma chapa

aquecedora e sua aderência ocorreu com a utilização de uma solução de ovoalbumina a 5% diluída em glicerina (Figura 4).

A coloração das lâminas foi efetuada com Hematoxilina e Eosina e sua montagem com a resina bálsamo do Canadá (Figuras 4 e 5).

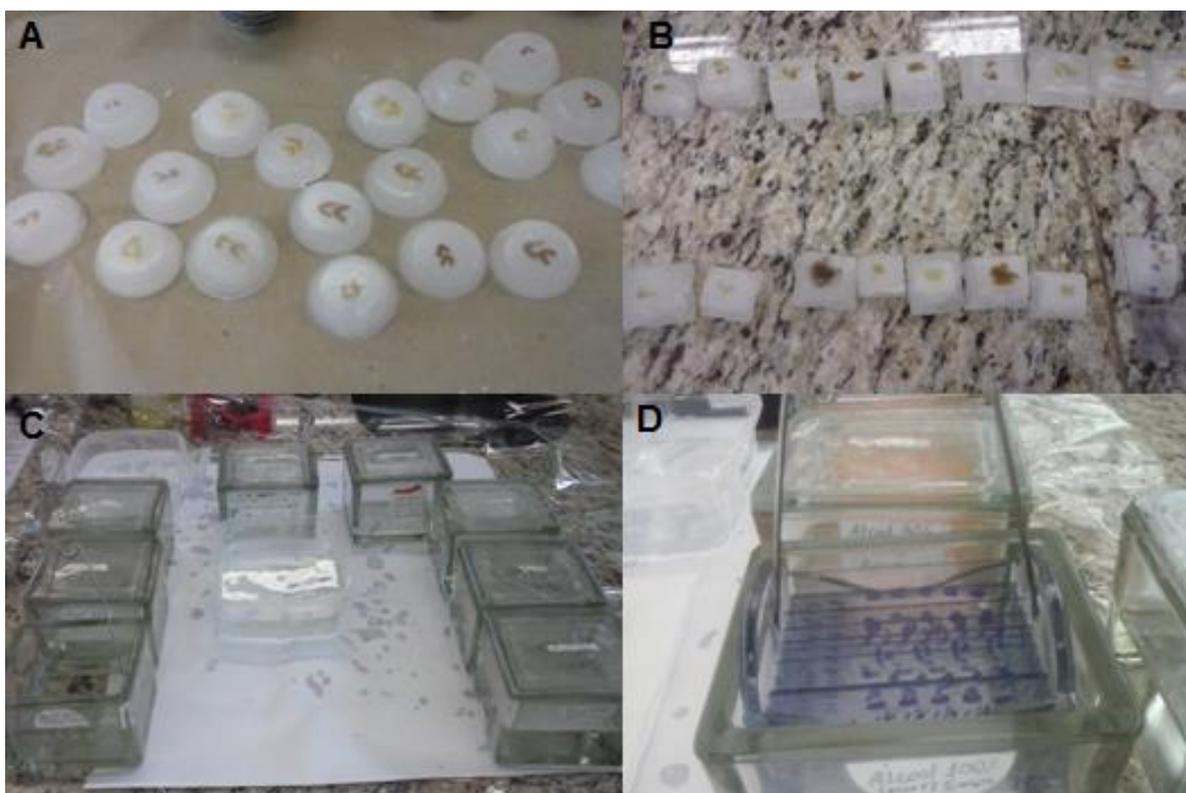


Figura 4 - Etapas do procedimento histológico. A: Blocos de resina histológica, tipo Paraplast®, incluídos com fragmentos de tecido braquial; B: Blocos trimados de fígado e prontos para serem microtomados; C e D: Bateria de coloração das lâminas.

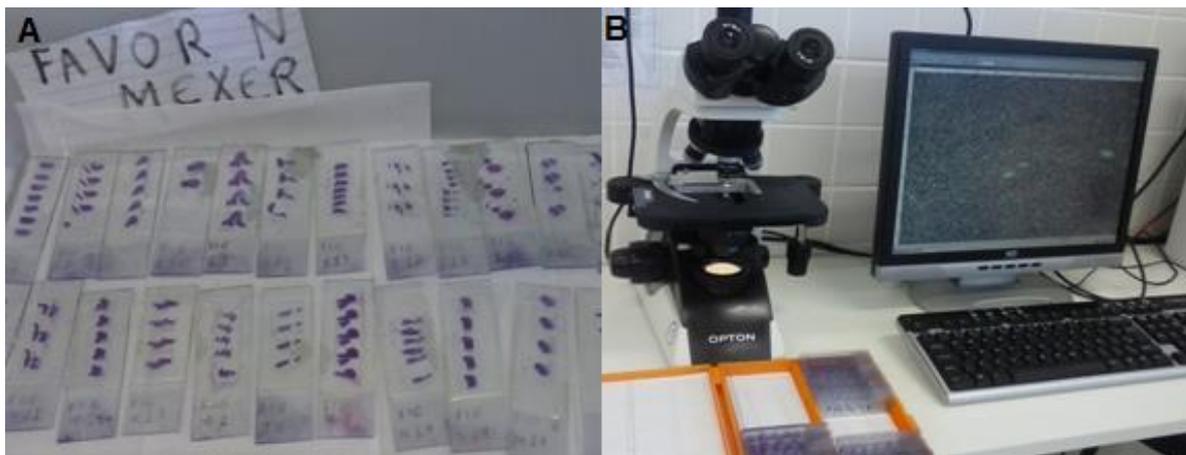


Figura 5 - Lâminas histológicas. A: Secagem das lâminas após sua montagem com a resina bálsamo do Canadá; B: Análise das lâminas em microscopia de luz.

4.3.2 Análise qualitativa das lâminas histológicas e quantificação dos danos

As lâminas de fígado e brânquia foram analisadas em microscopia de luz, percorrendo-se os campos de forma a não repeti-los. Para ambos os tecidos, utilizou-se as histopatologias propostas por Bernet et al. (1999), seguindo suas definições e critérios.

A quantificação também se baseou no mesmo autor, estimando-se o índice de Bernet. Este índice classifica os danos por tipo de reação padrão (Ex: distúrbio circulatório, reação inflamatória, etc) e quantifica as lesões de acordo com o seu fator de importância e o grau de extensão.

O fator de importância (w) varia de 1 a 3, sendo classificado segundo o grau de reversibilidade do dano. Assim $w = 1$ indica lesões de baixa importância patológica, sendo facilmente reversíveis; $w = 2$ reflete lesões de moderada importância patológica, sendo na maioria dos casos também são reversíveis quando o agente estressor é neutralizado; $w = 3$ evidencia lesões de acentuada importância patológica, que geralmente são irreversíveis e podem conduzir a perda parcial ou total da função do órgão. O grau de extensão (a) tem pontuação variando de 0 a 6, conforme a representatividade de cada tipo de dano no órgão analisado.

Com base na pontuação descrita anteriormente para cada tipo de lesão padrão, calculou-se dois índices: 1- índice por reação padrão, o qual foi obtido pelo

somatório dos danos por tipo de reação padrão; 2- índice do órgão, o qual versa sobre todas as reações padrões, somando-as. Este último representa a lesão total de um órgão ou de um indivíduo (índice de Bernet). As fórmulas de ambos os índices estão descritas a seguir:

Índice por reação padrão ($I_{org\ rp}$) – expressa as lesões por tipo de reação padrão

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

Índice do Órgão (I_{org}) - representa o grau de dano a um órgão

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

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

4.4 ESTIMATIVA DO FATOR DE CONDIÇÃO

Com base no modelo potencial de regressão e no método dos mínimos quadrados, determinou-se o coeficiente angular (b) da relação peso-comprimento para cada ponto, em cada estação do ano. O fator de condição alométrico foi estimado individualmente através da equação:

$$K = Pt/Ct^b$$

Onde: Pt = peso total; Ct = comprimento total; b = coeficiente angular da relação peso-comprimento.

4.5 ANÁLISE DE DADOS

Para avaliar os índices histopatológicos e o fator de condição em relação aos pontos amostrais e as duas estações do ano utilizou-se a análise estatística ANOVA bifatorial seguida pela aplicação do teste Tukey. Os pressupostos foram verificados e atendidos (QUINN; KEOUGH, 2002).

5 RESULTADOS

5.1 HISTOLOGIA DE BRÂNQUIA

As análises qualitativas das lâminas revelaram que as principais histopatologias encontradas em tecido branquial foram fusão lamelar parcial, fusão lamelar total e aneurismas (Figura 6). Também se observou a presença de parasitas e de locais de implantação de parasitas. Estes dois últimos não foram quantificados nas análises subsequentes.

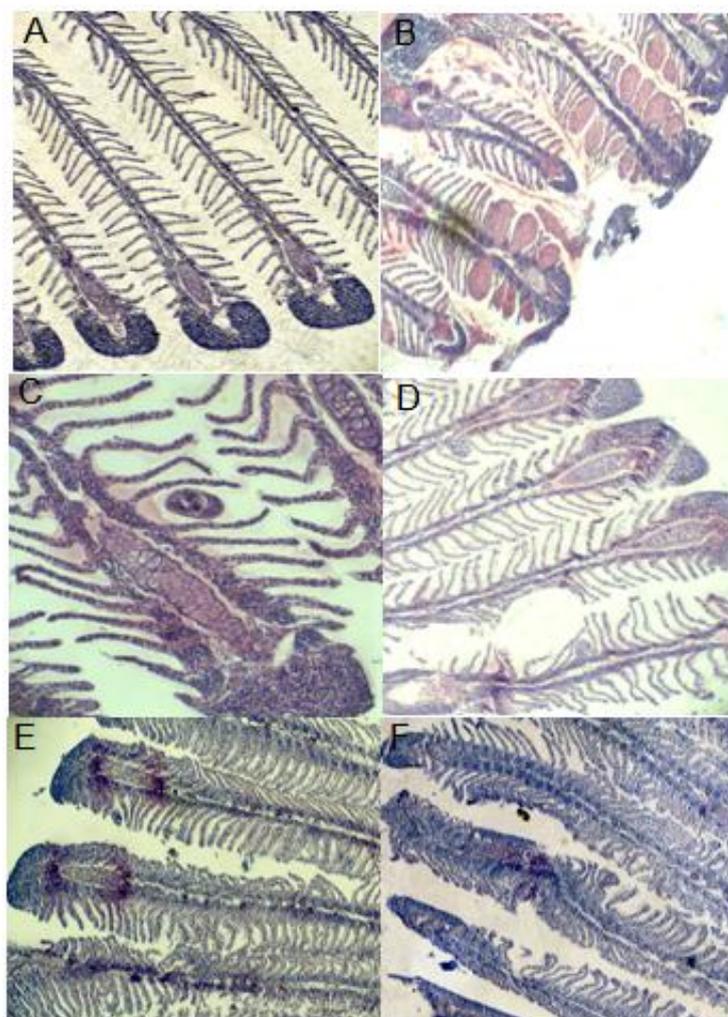


Figura 6 - Seções de tecido branquial de *H. ancistroides*. A. Lamelas normais (10X); B. Aneurismas (10X); C. Parasita (40X); D. Local de implantação de parasita (10X); E. Fusão parcial de lamelas (10X); F. Fusão total de lamelas (10X).

A partir da ANOVA bifatorial pode-se observar interação significativa entre os fatores Local e Estação do ano (Tabela 1). Com base no teste de Tukey, verificou-se que os menores valores de histopatologias ocorreram nos pontos montante e intermediário durante o inverno, enquanto os maiores índices foram constatados a jusante, também na estação inverno (Gráfico 1). No verão, os índices histopatológicos foram semelhantes entre os pontos amostrais.

Tabela 1 - Resultado do Teste ANOVA bifatorial para o índice histopatológico das brânquias, considerando os fatores Local e Estação do Ano. * valores significativos ($p < 0,05$); SS = soma dos erros ao quadrado; g.L= graus de liberdade; MS = média dos quadrados; F = valor do teste de Fisher.

Fatores	SS	g. L	MS	F	p-valor
Estação	1,06	1	1,06	0,83	0,365
Local	47,47	2	23,73	18,52	< 0,001*
Estação*Local	23,04	2	11,52	8,99	< 0,001*

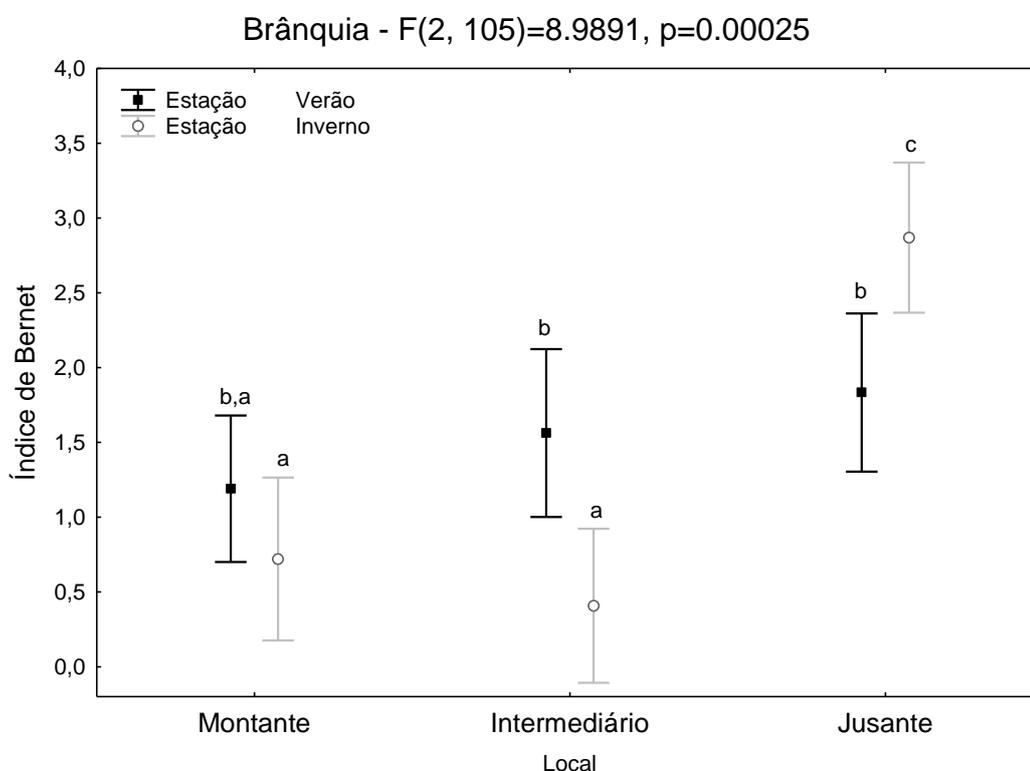


Gráfico 1. Comparação de médias do índice histopatológico das brânquias entre os três pontos amostrais do rio Pirapó-PR, considerando as duas estações do ano. Letras diferentes (a, b e c) representam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras de erros indicam o intervalo de confiança.

5.2 HISTOLOGIA DE FÍGADO

No tecido hepático, as principais lesões histopatológicas observadas pelas análises qualitativas foram respostas inflamatórias e vacuolização citoplasmática (Figura 7).

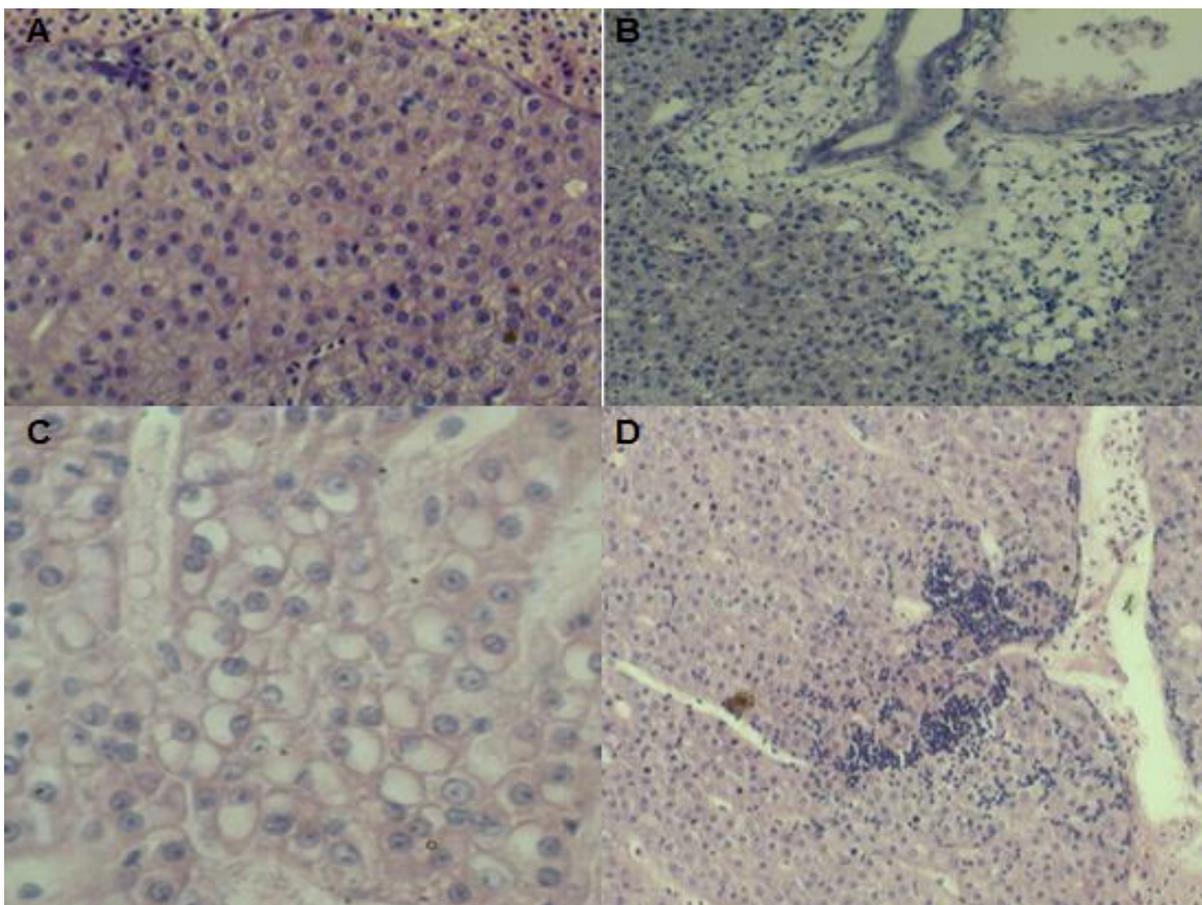


Figura 7 - Secções de tecido hepático de *Hypostomus ancistroides*. A Hepatócitos normais (10X); B Adipócitos (10X); C Vacuolização celular (40X); D Infiltração de macrófago (10X).

Através da ANOVA bifatorial constatou-se que apenas os locais tiveram influência significativa sobre a taxa de danos histopatológicos no fígado. Não houve interação entre os fatores e a estação do ano também não influenciou a taxa de danos (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado do Teste ANOVA bifatorial para o índice histopatológico de fígado, considerando os fatores Local e Estação do Ano. Legenda: * valores significativos ($p < 0,05$); SS = soma dos erros ao quadrado; g.L = graus de liberdade; MS = média dos quadrados; F = valor do teste de Fisher.

Fatores	SS	g. L	MS	F	p-valor
Estação	1,63	1	1,63	0,257	0,613
Local	61,77	2	30,88	4,868	0,010*
Estação*Local	0,57	2	0,28	0,045	0,956

A partir do teste de Tukey, verificou-se que o índice histopatológico do fígado seguiu o padrão de gradiente, com os menores valores observados no ponto montante, valores medianos no ponto intermediário e os maiores valores foram constatados no ponto jusante (Gráfico 2).

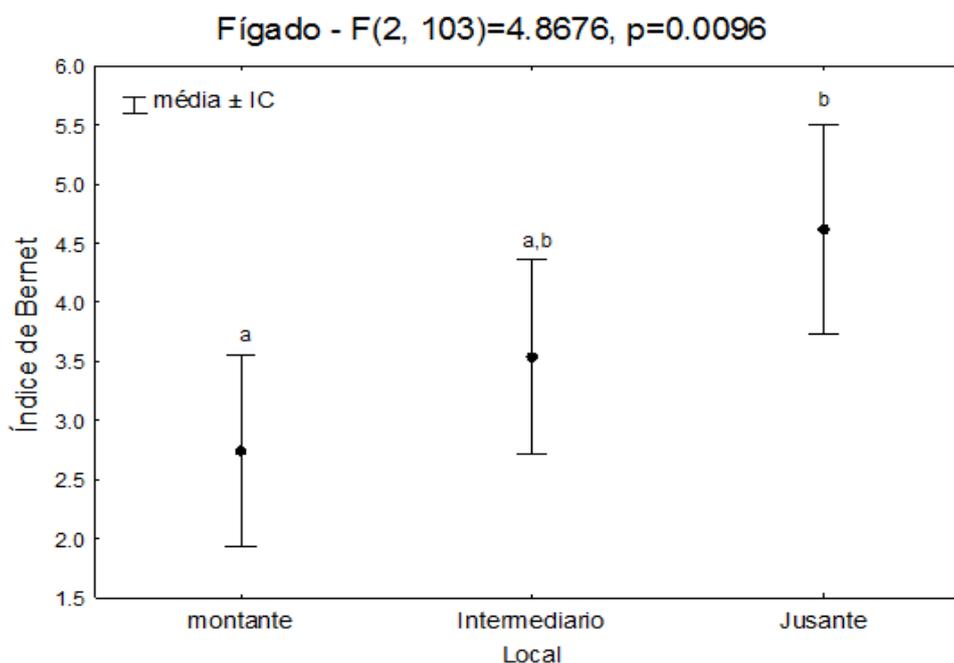


Gráfico 2. Comparação de médias dos índices histopatológicos de fígado entre os três pontos amostrais do rio Pirapó. Letras diferentes (a, b) representam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$). IC = intervalo de confiança.

5.3 FATOR DE CONDIÇÃO

Com base na ANOVA bifatorial verificou-se interação significativa entre os fatores ponto amostral e estação do ano (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado do Teste de ANOVA bifatorial para o fator de condição, considerando os fatores Local e Estação do Ano. Legenda: * valores significativos ($p < 0,05$); SS = soma dos erros ao quadrado; g.L = graus de liberdade; MS = média dos quadrados; F = valor do teste de Fisher.

Fatores	SS	g. L	MS	F	p-valor
Estação	0,003855	2	0,00192	348,94	< 0,001*
Local	0,001005	1	0,00101	181,91	< 0,001*
Estação*Local	0,000154	2	0,00007	13,91	< 0,001*

O teste Tukey revelou que, em ambas as estações do ano, os maiores valores de K ocorreram sempre no ponto montante e os menores no ponto intermediário. Diferenças significativas foram observadas entre as estações do ano, sendo o K do verão superior ao do inverno. Os indivíduos do ponto jusante também estiveram submetidos a uma condição de baixo K, inclusive tendo valor similar ao ponto intermediário (verão) (Gráfico 3).

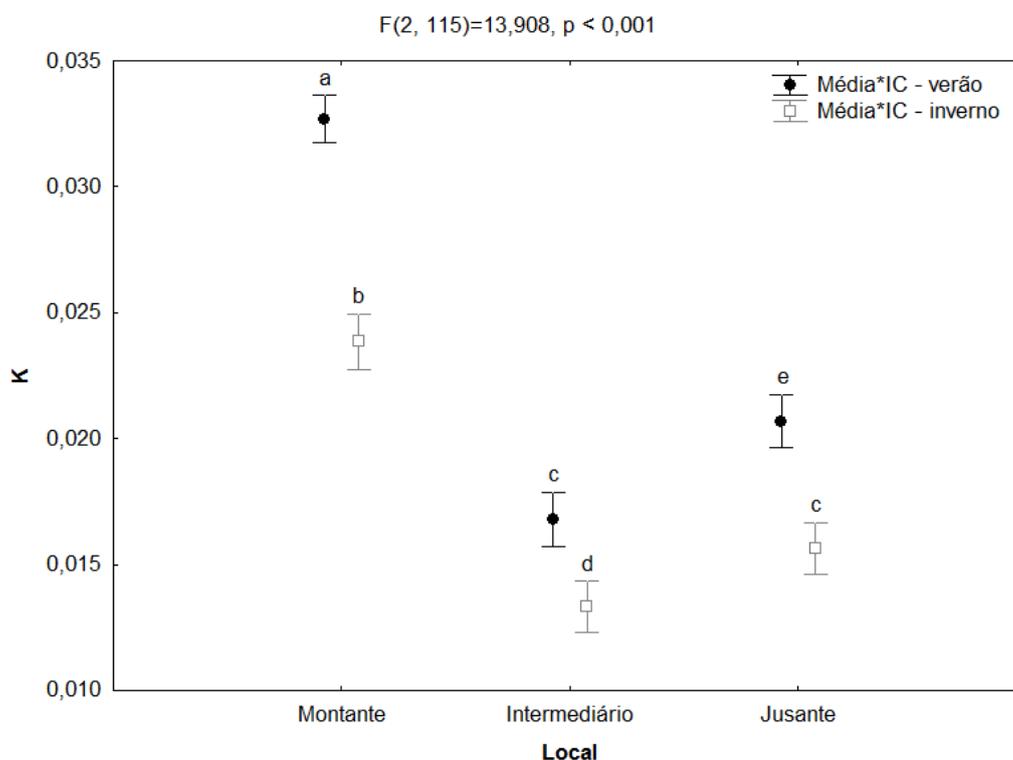


Gráfico 3 - Comparação de médias do fator de condição (K) entre os três pontos amostrais do rio Pirapó, considerando as duas estações do ano. Letras diferentes (a, b, c, d, e) representam diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0,05$). IC = intervalo de confiança.

6 DISCUSSÃO

O maior índice histopatológico em tecido branquial verificado em indivíduos do ponto jusante pode ser atribuído a maior exposição dos animais aos xenobiontes que alcançam o local, sugerindo um acúmulo destas substâncias neste local. Este ponto recebe um somatório de resíduos, principalmente agroquímicos e efluentes da estação de tratamento de esgoto. Ainda, observa-se que em suas imediações a cobertura vegetal é insuficiente para filtrar os resíduos das atividades antrópicas e, portanto, a qualidade da água deste local está comprometida e isso reflete na sanidade dos animais.

O ponto a jusante também está rodeado por áreas urbanizadas que interferem seriamente nos sistemas naturais, aumentando os processos erosivos e escoamentos superficiais (CASSARO; CARREIRA, 2001) e, provavelmente, agindo como um facilitador na entrada dos poluentes na área, reduzindo sua qualidade.

Os efeitos de contaminantes ambientais sobre o tecido branquial tornam-se preocupantes em vista as importantes funções desempenhadas por este órgão, como por exemplo, respiração, regulação osmótica e iônica, de forma que o prejuízo no seu funcionamento pode ocasionar a morte do organismo (HINTON, 1990). Nesse trabalho as principais histopatologias em brânquias foram respectivamente fusão lamelar parcial, fusão lamelar total e aneurismas.

Fusões lamelares resultam da excessiva proliferação de células epiteliais do filamento e, de acordo com (HEATH, 1987) consistem num mecanismo natural de defesa para proteger o epitélio lamelar do contato direto com agentes tóxicos. Tais alterações inespecíficas podem resultar de estressores variados, entre os quais se destacam metais, amônia, fenóis, infecções por microrganismos e até mesmo ectoparasitas (HINTON et al., 1992).

Aneurismas normalmente resultam do colapso do sistema de células pilares e, prejudicam a integridade vascular com a liberação de grande volume sanguíneo que empurra o epitélio lamelar para fora (HINTON, 1990).

A presença de parasitas, como verificado nos peixes do presente trabalho, também é prejudicial à qualidade respiratória destes animais e conforme Akaishi et

al. (2004) pode ter relações com uma defesa imune-deficiente, problemas ácido-base ou ainda osmorregulatórios.

Em fígado, apenas o fator local teve influência significativa quanto aos índices histopatológicos, sendo os valores crescentes em relação aos pontos montante, intermediário e jusante. Os resultados apresentados provavelmente relacionam-se com o gradiente de poluição antrópica observado ao longo dos pontos amostrais, visto que a concentração de xenobiontes no meio aumenta a incidência de injúrias químicas no fígado (HINTON et al., 1992).

Conforme Cassaro e Carreira (2001) a degradação da bacia do Pirapó é acentuada pelo lançamento de efluentes líquidos de diversas características físico-químicas e biológicas, tais como carga orgânica de frigoríficos, detergentes industriais, águas pluviais contaminadas com efluentes industriais, além de encontrar-se assoreado devido à falta de vegetação natural ao longo de suas margens.

O fígado é um órgão especialmente sensível à poluição e desempenha inúmeras funções essenciais aos organismos, fato que aumenta a preocupação com a bioacumulação e saúde pública. Dentre suas funções enquadram-se o metabolismo de carboidratos, armazenamento de lipídios, síntese e oxidação de ácidos graxos, armazenamento de glicogênio, além de se constituir no principal centro de detoxificação (HEATH, 1987).

Neste estudo as alterações histopatológicas mais frequentes em fígado foram respostas inflamatórias e vacuolização citoplasmática, as quais se constituem em respostas comuns de peixes expostos a ambientes aquáticos degradados.

As respostas inflamatórias observadas constituíram-se na infiltração do tecido hepático por macrófagos, células de defesa com importante papel na resposta imune a agentes estranhos, cuja função é remover através de fagocitose, partículas estranhas derivadas da degradação celular (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2012).

De acordo com Oliveira-Ribeiro et al. (2012), a vacuolização celular torna-se um dano a partir do momento em que o metabolismo celular é alterado em consequência de um estresse químico. Desta maneira pode haver o acúmulo de substâncias no citosol que interferem no funcionamento normal da célula e podem acarretar maiores prejuízos, tais como necrose ou apoptose. Ainda, segundo o mesmo autor, o acúmulo de lipídios em vesículas constitui-se em um mecanismo de resposta celular quando na presença de agentes químicos lipofílicos, numa tentativa

de imobilizar tais substâncias, impedindo sua interação com os demais componentes celulares e desta forma minimizar seu efeito tóxico.

No que se refere ao fator de condição, os elevados valores de K atribuídos ao ponto montante refletem a melhor condição nutricional e de bem-estar animal dos peixes associados ao ambiente mais preservado. Por outro lado, os menores valores de K do ponto intermediário somado aos baixos valores registrados na jusante indicam que estes indivíduos estão submetidos a um maior nível de estresse ambiental em função de intensas atividades agrícolas e industriais praticadas nas suas proximidades.

Os peixes são organismos que dependem diretamente da saúde do ambiente para realização de processos vitais, tais como respiração, forrageamento, reprodução, crescimento e defesa contra predadores (SÃO PAULO, 2015), ainda mais quando apresentam baixo potencial migratório ou de deslocamento, como pode ser visto para *H. ancistroides*. Desta forma, a espécie em ambientes preservados mantém suas funções orgânicas em equilíbrio, conseguindo um melhor estado nutricional e sanitário, como de fato foi verificado no local referência.

Por outro lado, os indivíduos submetidos a maior concentração de agentes estressores e em ambientes com menor cobertura vegetal, como visto nos pontos intermediário, principalmente jusante, apresentam maior dificuldade na incorporação de nutrientes e, provavelmente, na manutenção das suas funções fisiológicas básicas, fato que pode levar a um declínio da espécie nestes ambientes.

Estes impactos atribuídos aos pontos intermediário e jusante são corroborados pelos estudos de Oliveira (2004) e Peruço (2006), que trabalharam ao longo da bacia do Pirapó. Estes autores destacaram em seus trabalhos a existência de extensas áreas desprotegidas de vegetação, com invasões de residências, associações recreativas, chácaras, dentre outras edificações nas suas proximidades. Além de relatarem um intenso desmatamento, os autores constataram a presença de grande quantidade de entulhos e de lixo na água. Em concordância a estes estudos, Alves et al., (2008) descreveram que a contaminação das águas do rio Pirapó é gerada principalmente pelo lançamento clandestino de esgoto e pelo escoamento superficial e químicos injetados no solo, sendo estas ações responsáveis pela alteração de características físico, químicas e biológicas no rio.

No que diz respeito a estação de coleta foi verificado que os indivíduos coletados durante o verão, independente do local, apresentaram maior valor de K

quando comparados aos coletados no inverno. Este resultado sugere que os animais aproveitam a maior disponibilidade de recursos dessa estação para incorporar peso e melhorar seu estado nutricional (GHISI et al., 2012). No mesmo sentido Jobling (1995) descreve que durante o verão a maior temperatura e pluviosidade, aumentam a atividade dos organismos decompositores e por isso ocorre maior disponibilidade de nutrientes, que são logo absorvidos pelos produtores e ficam disponíveis aos níveis tróficos seguintes.

Em outras palavras, sabe-se que o fator de condição é uma métrica influenciada pelas variações ambientais naturais ao longo do ano. No entanto, a elevada variação de K observada entre os pontos amostrais dentro de uma mesma estação do ano, reforça a argumentação de interferência antrópica nos trechos mais urbanizados do rio.

Desta forma, o conjunto de alterações observadas nos indivíduos de *H. ancistroides*, principalmente naqueles oriundos dos pontos jusante e intermediário reforça a ideia de estresse ocasionado pelo acúmulo de xenobióticos em vista da maior proximidade destes locais com a área urbana de Maringá. Em síntese os resultados apresentados demonstram que os espécimes analisados estiveram expostos a uma gama de substâncias químicas estressoras, as quais parecem realmente se acumular ao longo do gradiente de poluição proposto, diminuindo progressivamente a sanidade desses peixes e provavelmente a qualidade de vida dos demais organismos que dependem do ecossistema em estudo.

7 CONCLUSÕES

Os indivíduos de *H. ancistroides* dos pontos intermediários e jusantes estão submetidos a um maior estresse ambiental decorrente de efeitos antropogênicos, agravados pela baixa cobertura de vegetação ciliar.

As análises histopatológicas confirmaram a hipótese de que indivíduos expostos ao maior nível de contaminação estão mais susceptíveis a danos teciduais. As alterações histológicas no fígado demonstram um gradiente de contaminação existente no rio Pirapó, o que se torna uma preocupação de saúde pública, considerando a sua grande utilização pela população da região.

O fator de condição (K), independentemente da variação ambiental intra-anual, mostrou que os indivíduos submetidos a condições antrópicas apresentaram sua nutrição e sanidade prejudicadas. Desta forma, o K constitui-se num bom indicador de qualidade ambiental

Os biomarcadores constituem-se em importantes ferramentas para detecção dos efeitos tóxicos de poluentes sobre organismos bioindicadores. No entanto, para que possa obter um diagnóstico mais preciso a respeito da ação de agentes químicos tóxicos é recomendado que sejam analisados de forma conjunta, pois quanto mais variados forem os biomarcadores empregados nestes estudos mais bem fundamentado tornam-se seus resultados e com isso alcançam maior credibilidade diante da sociedade em geral.

Resultados como estes devem considerados pelos gestores da bacia do rio Pirapó quanto às tomadas de decisões acerca deste corpo hídrico. Além de serem fundamentais para a elaboração de políticas públicas que priorizem a recuperação e conservação das áreas de vegetação ciliar do seu entorno. Também alertam para a necessidade de fiscalizações mais efetivas no que diz respeito aos componentes xenobióticos que estão adentrando o local e com isso diminuindo sua qualidade ambiental, o que por consequência compromete a qualidade de vida dos organismos que dele dependem direta ou indiretamente.

REFERÊNCIAS

- AKAISHI, Fabiuola M.; ASSIS, Helena Cristina da S.; JAKOBI, Sibeles et al. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 253, p. 244-253, 2004.
- ALVES, Eliane Cristina; SILVA, César F.; COSSICH, Eneida S.; TAVARES, Célia Regina G.; SOUZA-FILHA, Edvard de S.; CARNIEL, Ademir. Avaliação da qualidade da água da bacia do rio Pirapó – Maringá, Estado do Paraná, por meio de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, p. 39-48, 2008.
- 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.
- ARAÚJO, C. C.; PEREIRA, W. R. L. S.; FLYNN, M. N. Fator de condição e relação peso-comprimento de *Mugil curema* valenciennes, 1836 (pisces, mugilidae) como indicadores de estresse Ambiental. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, p. 51-64, 2011.
- ARELLANO, Juan M.; STORCH, V.; SARASQUETE, Carmen. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.4, p. 62-72, 1999.
- ARIAS, Ana Rosa L.; BUSS, Daniel F.; ALBURQUERQUE, Carla de; 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.
- BARBOUR, Michael T.; GERRITSEN, Jeroen; SNYDER, Blaine D.; STRIBLIND, James B. **Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish**. 2. nd. Washington: Environmental Protection Agency, Office of Water, 1999.
- BARRETO, Luciano V.; BARROS, Flávia Mariani; BONOMO, Paulo; ROCHA, Felizardo A.; AMORIM, Jhones S. Eutrofização em rios brasileiros. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.16, p. 2165-2179, 2013.
- BERNET, Daniel; SCHIMID, Heike; MEIER, Walter; BURKHARDT-HOLM, Patricia.; WAHLI, Thomas. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BONATO, Karine O; ARAÚJO Maria I.; DELARIVA, Rosilene L. Dieta e morfologia trófica de *Hypostomus ancistroides* (Ihering, 1911) em dois riachos na região de Maringá, Paraná. **Anais da IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar**, Maringá, 2008.
- BRAGA, Benedito; HESPANHOL, Ivanildo; CONEJO, João G. L.; MIERZWA, José Carlos; BARROS, Mario Thadeu L.; SPENCER, Milton; PORTO, Monica; NUCCI, Nelson; JULIANO, Neusa; EIGER, Sérgio. **Introdução à engenharia ambiental**. 2. ed. São Paulo, v.1, p. 318, 2005.

BRITO, Francisco E. M. Rachel Carson e os gritos da primavera silenciosa. **Conjuntura e planejamento**, v 170, p. 50-51, 2011.

CALHEIROS, Débora F; OLIVEIRA, Márcia Divina; DORES, Eliana F. G. Poluição por pesticidas, nutrientes e material em suspensão nos rios formadores do Pantanal Matogrossense. **Embrapa Pantanal**, Corumbá, n. 96, p. 1-4, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM096.pdf>>. Acesso em: 02 Mar. 2015.

CASSARO, Lorenzo; CARREIRA, Manoel Francisco. Fatores da degradação ambiental da bacia de captação de água para a cidade de Maringá - Rio Pirapó. **Sanare (SANEPAR)**, v. 16, p. 10/16, 2001.

CARSON, Rachel. **Primavera silenciosa**. 2 ed. Tradução: Raul de Polillo. São Paulo: Editora Melhoramentos, 1962.

CUNICO, Almir M.; FERREIRA, Eveline A.; AGOSTINHO, Ângelo C.; BEAUMORD, Antonio C.; FERNANDES, Rodrigo. The effects of local and regional environmental factors on the structure of fish assemblages in the Pirapó Basin, Southern Brazil. **Landscape and Urban Planning**, v. 105, p. 336-344, 2012.

DOMINGOS, Fabíola X. B. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. 2006. 130 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/7850>> Acesso em 19 Mai. 2015, 23:10.

ESTEVES, Francisco de A. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FEIJÓ, Cláudia C. C. Introdução à gestão ambiental. In: ZÔMPERO, Andréia F; CORTEZ, Mateus M.; GARCIA, José L. F.; ROHLOFF, Débora B.; FEIJÓ, Cláudia C. C. **Gestão ambiental: fundamentos lógicos, críticos e analíticos**. Londrina: Unopar, 2008.

GHISI, Nédia de C. Relationship between biomarkers and pesticide exposure in fishes: a review. In: SOUNDARARAJAN P. Raga P. **Pesticides: advances in chemical and botanical pesticides**. Rijeka: InTech, 2012. p. 357-382.

GRAÇA, Weferson J.; PAVANELLI, Carla S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: Eduem, 2007.

HEATH, ALAN G. **Water Pollution and Fish Physiology**. C.R.C. Press, 1987.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51- 66, 1990.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

ITO, Kátia M. **Histopatologia de brânquia e fator de condição de *Astyanax aff. paranae* (pisces) como indicadores de contaminação aquática no centro-noroeste do Paraná.** 2013. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Curso Superior em engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

JOBLING, Mark. **Environmental Biology of Fishes.** London: Chapman & Hall, 1995. p. 455

MATASIN, Zeljka; IVANUSIC, Marko; ORESCANIN, Visnja; NEJEDLI, Srenrenka; GAJGER, Ivana T. Heavy metal concentrations in predator fish. **Journal of animal and veterinary advances**, v.10, p. 1214-1218, 2011.

MONTOYA-BURGOS, Juan I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 1855-1867, 2003.

OLIVEIRA, Taísa M. **Diagnóstico da qualidade físico-química e biológica da Bacia do Alto Rio Pirapó.** 120 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

OLIVEIRA-RIBEIRO, Ciro A.; FILIPAK NETO, Francisco; RABITTO, Inês da S.; MELA, Maritana; GARGIONI, Rogério; BUSSULARO, Daniel. Cito e histopatologia: avaliação de estresse químico. In: OLIVEIRA RIBEIRO, Ciro A.; REIS FILHO, Herculano S.; GRÖTZNER, Sonia Regina. **Técnicas e métodos para utilização prática de microscopia.** 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 2012. p. 307-319.

OLIVEIRA-RIBEIRO, Ciro A; VOLLAIRE, Yan; SANCHEZ-CHARDI, Alejandro; ROCHE, Helene. 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.

PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica.** Curitiba, 2010. 138 p.

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.

PERUÇO, Joseana Débora. **Identificação das principais fontes poluidoras de afluentes da bacia do alto rio Pirapó.** 63 p. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

QUINN, Gerry P; KEOUGH, Michael J. **Experimental design and data analysis for biologists.** Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

REIS, Roberto E.; KULLANDER, Sven O.; FERRARI, Carl J. **Lista de verificação dos peixes de água doce do sul e da América Central.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p. 242.

SÃO PAULO. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Metabolismo dos poluentes em peixes**. Disponível em: < <http://mortandadedepeixes.cetesb.sp.gov.br/metabolismo-dos-poluentes-nos-peixes/>>. Acesso 08 Nov. 2015.

SMITH, Val H.; SCHINDLER, David W. Eutrophication science: where do we go from here? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, p. 201-207, 2009.

TOWNSEND, Colin R.; BEGON, Michael; HARPER, John L. **Fundamentos em ecologia**. 3 ed. Tradução: Adriano Sanches Melo. Porto Alegre: Artmed, 2010.

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

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.

VIARENGO, Aldo. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences**, v.1, p. 295-317, 1989.

WOOTTON, Robert J. **Ecology of teleost fishes**. 2nd ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1999, 396p.