

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

GUILHERME VICTOR VANZETTO

**A UTILIZAÇÃO DE BIOINDICADORES PARA AVALIAR O  
POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DAS ÁGUAS DO RIO  
PIRAPÓ, REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

GUILHERME VICTOR VANZETTO

**A UTILIZAÇÃO DE BIOINDICADORES PARA AVALIAR O  
POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DAS ÁGUAS DO RIO  
PIRAPÓ, REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão como requisito para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira.  
Co-orientador(a): Prof(a). Dra. Nédia de Castilhos Ghisi.

CAMPO MOURÃO

2014



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



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

A UTILIZAÇÃO DE BIOINDICADORES PARA AVALIAR O POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DAS ÁGUAS DO RIO PIRAPÓ, REGIÃO NORTE DO PARANÁ, BRASIL.

por

GUILHERME VICTOR VANZETTO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 28 de Fevereiro de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Elton Celton Oliveira  
Orientador

---

Prof.(a) Dr.(a) Nédia de Castilhos Ghisi  
Co – orientadora

---

Prof.(a) MSc. Fernanda Peres Ramos  
Membro titular

---

Prof. Dr. Eudes José Arantes  
Membro titular

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

Ao Senhor, que me concedeu serenidade  
para aceitar as coisas que não pude mudar  
coragem para mudar as que podiam e  
sabedoria para distinguir uma da outra.

- Reinhold Niebuhr.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer aos meus pais Ildo Agostinho Vanzetto e Suzimar Maria Pavan Vanzetto que em nenhum momento duvidaram da minha capacidade e jamais deixaram de me apoiar e de ser uma fonte inesgotável de compreensão. Devo a eles cada uma de minhas vitórias.

A minha irmã Suelen, sempre presente em minha vida e onde eu posso encontrar apoio nos percalços do caminho. Agradeço, em especial, a toda minha família que, mesmo muitas vezes sem compreender, nunca deixaram de me apoiar e de ser um porto seguro para mim.

A minha namorada Laura, responsável pela minha dedicação, garra e determinação, em especial pela compreensão em minha ausência. Exemplo de que o amor não pode ser diminuído pela distância.

Ao amigo, professor e orientador Elton Celton de Oliveira, por me orientar com sua sabedoria, pelo tempo dedicado ao meu trabalho, um exemplo de determinação, profissionalismo e dignidade.

A amiga co-orientadora, Nédia de Castilhos Ghisi, que nunca hesitou em sanar uma dúvida ou de colaborar para o bom andamento dos trabalhos que realizamos.

Aos colaboradores da UEM, em especial para o Gabriel, o Fagner e a Thaís pelo auxílio em campo e na identificação dos espécimes. Ao prof. Alberto J. Prioli pelo espaço cedido e pelo empréstimo de reagentes.

A todos os professores que passaram pela minha graduação, em especial ao Eudes e ao Thiago, pela colaboração neste trabalho.

Aos colegas Jacque e Raíssa, pelo auxílio nas coletas.

Aos amigos e familiares, que estavam perto e àqueles que não estavam, aos companheiros de república e todos aqueles com quem convivi ao longo dessa jornada. Esses anos certamente permanecerão para sempre nas minhas melhores memórias.

Enfim, obrigado a todos que fazem parte da minha vida e, que de uma forma, ou outra, foram responsáveis e testemunhas de minhas conquistas.

## RESUMO

VANZETTO, Guilherme V. **A utilização de bioindicadores para avaliar o potencial mutagênico e citotóxico das águas do rio Pirapó, região norte do Paraná, Brasil.** 2014. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

A água é um elemento fundamental para a vida e seus múltiplos usos são, atualmente, indispensáveis para as atividades humanas. O despejo de poluentes de origem industrial, doméstica ou agrícola vem afetando negativamente a biodiversidade aquática. Neste sentido fazem-se necessários estudos para monitoramento ambiental, utilizando-se parâmetros biológicos, tais como bioindicadores e biomarcadores. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e mutagênicos das águas do rio Pirapó, região norte do Paraná, a partir do estudo de bioindicadores e biomarcadores ambientais. O rio Pirapó é um dos principais corpos d'água da região Norte do Estado do Paraná, sendo utilizado pelas cidades de Apucarana e Maringá (terceira maior cidade do Paraná) para o abastecimento público de água e/ ou eliminação de águas residuais urbanas (Estação de Tratamento de Esgoto - ETE). Determinaram-se três pontos de amostragem ao longo deste rio: 1 - a montante: nascente do rio, em Apucarana; 2 - intermediário: em Maringá, após a captação de água e lançamento de efluentes industriais; 3 - a jusante: em Maringá, após o lançamento da ETE. Foram coletados exemplares do peixe *Hypostomus ancistroides* para avaliar a taxa de formação de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares no verão e no inverno de 2013. Ainda, fez-se o registro de dados abióticos durante a coleta de água para a realização dos bioensaios de mutagenicidade com *Allium cepa* no verão de 2014. Procedeu-se o tratamento estatístico a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni para avaliar as anormalidades nucleares nos peixes. Para *A. cepa* realizou-se apenas uma avaliação qualitativa dos danos. Os peixes do ponto intermediário foram os que apresentaram maior número de alterações morfológicas nucleares e micronúcleos para ambas as estações do ano. Os dados abióticos pontuais aliados às análises qualitativas do bioensaio com *Allium cepa* corroboraram com os resultados obtidos para os peixes deste ponto. Conclui-se que o ponto intermediário está sob a influência de poluentes, provavelmente ligada a descarga de águas residuais industriais ou a intensa atividade agrícola desenvolvida neste local. Sabendo-se que o rio abastece a cidade de Maringá e todas as cidades do entorno o estudo revela preocupante potencial de contaminação das águas, podendo tornar-se inviável para abastecimento público.

**Palavras-chave:** Biomarcadores. Monitoramento ambiental. Poluição. Qualidade da água.

## ABSTRACT

VANZETTO, Guilherme V. **Use of bioindicators to assess the mutagenic and cytotoxic potential of the Pirapó River water, northern Paraná, Brazil.** 2014. 39f. Conclusion of the course work (Bachelor of Environmental Engineering) - Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2014.

Water is a fundamental element factor to life and, its multiple utilities are, nowadays, indispensable to human activities. The discharge of pollutants from industrial, domestic and agricultural source is negatively affecting the aquatic biodiversity. In this way, studies are necessary to environmental monitoring, notably those using biologic measures, as bioindicators and biomarkers. This study aimed to evaluate the cytotoxic and mutagenic effects of Pirapó River waters, northern Paraná, through environmental bioindicators and biomarkers. Pirapó River is one of the principal water bodies of Paraná northern, and it is used by Apucarana and Maringá cities (third biggest city of Paraná State) for water public supplies and urban wastewater disposal (Sewage Treatment Station - STS). In this river, three sampled site were chosen: 1 – upstream site: in river springs, Apucarana; 2 – midstream: in Maringá, after the water caption and industrial wastewater release; 3 – downstream: in Maringá, after the release of STS. Individuals of fish *Hypostomus ancistroides* were sampled to assess the micronucleus formation and nuclear morphological alteration rates in summer and winter 2013. Abiotic data were recorded during the water sample to perform mutagenicity teste with *Allium cepa* bioassay in summer 2014. The nuclear abnormalities data of *H. ancistroides* were statistically tested with Kruskal-Wallis test followed by Mann Whitney with Bonferroni correction. To *A. cepa* was performed only a qualitative evaluation of genetic damages. The fishes of midstream site presented the highest values of nuclear morphological alterations and micronucleus, in both seasons. The punctual abiotic data associated with qualitative analysis of *A. cepa* bioassay corroborate the outcomes of fishes from midstream. In conclusion, our results indicate that the midstream site is under influence of pollutants, probably related to discharge of wastewater form industrial or agricultural activities developed surround this site. Knowing that Pirapó River supplies Maringá and nearby cities, our outcomes reveal data of preoccupant potential contamination into this water body, which can become it useless to public supply.

**Keywords:** Biomarkers. Environmental Monitoring. Pollution. Water quality.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Área de coleta no 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. Fonte: O autor..... 17
- Figura 2: 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. Fonte: O autor. .... 17
- Figura 3: Exemplar do bioindicador estudado, *Hypostomus ancistroides*, capturado no rio Pirapó. Fonte: O autor..... 18
- Figura 4: Exemplares de *Allium cepa*, espécie escolhida para os bioensaios e submetida aos tratamentos. Fonte: O autor. .... 18
- Figura 5: Método de confecção de lâminas para o teste do micronúcleo pisceo realizando o esfregaço de sangue, as letras indicam os seguintes passos: A – Realização da punção cardíaca nos indivíduos; B – Uma gota de sangue dos indivíduos é colocada na lâmina; C – Com o auxílio de uma lâmina é realizado o esfregaço. Fonte: Adaptado de (MARION, 2012)..... 20
- Figura 6: Alterações celulares que podem ser encontradas em eritrócitos de peixes durante a realização do teste cego em células já coradas com guiemsa 10%, envolvendo o teste do micronúcleo pisceo. Fonte: JIRAUNGKOORSKUL; SAHAPHONG (2007). .... 21
- Figura 7: Ilustração do procedimento de confecção de lâminas para o teste de *A. cepa*. Fonte: Adaptado de (BARBÉRIO, 2013). .... 23
- Figura 8: Prancha com tipos de alterações morfológicas nucleares encontradas em eritrócitos de *H. ancistroides*, capturados no rio Pirapó. (A.) núcleo normal; (B.) célula com micronúcleo; (C.) núcleo com bolha; (D, F.) núcleo entalhado; (E.) núcleo vacuolizado. Fonte: O autor. .... 25
- Figura 9: Resultados do teste de alterações morfológicas nucleares de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Pirapó (A.) coleta de verão (B.) coleta de inverno. Fonte: O autor. .... 26
- Figura 10: Resultados para teste do micronúcleo de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Pirapó (A.) durante o verão (B.) durante o inverno, a montante (Upstream), ponto intermediário (Middle), a jusante (Downstream). Letras diferentes (a, b e c) correspondem diferença significativa no teste post hoc de Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ . Fonte: O autor. .... 27
- Figura 11: Fotomicrografias das células do meristema radicular de *Allium cepa*, em coloração Carmin acético 1%. A – célula em interfase (objetiva = 100X); B – células em prófase e metáfase (objetiva = 100X); C – célula em anáfase (objetiva = 40X); D – células em anáfase (a) e telófase (t) (objetiva = 40X); E – célula em anáfase, com uma ponte anafásica (seta branca; objetiva = 100X); F – célula em anáfase, com um cromossomo retardado (seta amarela; objetiva = 100X); G – célula em interfase, com uma bolha no núcleo (seta vermelha; objetiva 40X); H – célula em interfase, com um micronúcleo (estrela; objetiva = 40X). Fonte: O autor. .... 29



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores obtidos através do teste de Kruskal Wallis com os dados de anormalidades nucleares de <i>H. ancistroides</i> nos pontos amostrais. * indicam os valores significativos ( $p < 0,05$ ).....	26
Tabela 2 – Valores obtidos através do teste de Kruskal Wallis com os dados de anormalidades nucleares de <i>H. ancistroides</i> nos pontos amostrais. * indicam os valores significativos ( $p < 0,05$ ).....	27
Tabela 3 – Dados abióticos da água obtidos nos pontos de coleta. ORP: Potencial de Oxirredução. OD: Oxigênio Dissolvido. Baros: Pressão Barométrica. mV: milivolts. NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez. ....	28

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVOS .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	16
4.2 ESPÉCIES BIOINDICADORAS .....	17
4.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL .....	19
4.3.1 <i>Hypostomus ancistroides</i> .....	19
4.3.2 <i>Allium cepa</i> .....	21
4.4 ANÁLISE DE DADOS.....	23
5 RESULTADOS .....	25
5.1 <i>Hypostomus ancistroides</i> .....	25
5.2 <i>Allium cepa</i> .....	27
6 DISCUSSÃO .....	30
7 CONCLUSÃO.....	34
REFERENCIAS.....	35

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um elemento fundamental para a vida e seus múltiplos usos são, atualmente, indispensáveis para as atividades humanas (ALVES *et al.*, 2008). As atividades relacionadas ao abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação estão entre as mais comuns em todo o mundo e são consideradas potencialmente poluidoras. Sobre a poluição de águas, Derisio (1992) caracteriza cinco tipos de fontes de poluição: poluição natural, poluição industrial, poluição urbana, poluição agrícola e a poluição acidental.

O despejo de poluentes de origem industrial, doméstica ou agrícola na água vem afetando negativamente a biodiversidade aquática, bem como a saúde da população humana que depende destes corpos hídricos para sobreviver e manter seu estilo de vida. Muitos destes poluentes lançados nos corpos d'água não são removidos pelos métodos tradicionais de depuração, nas estações de tratamento da água e na autodepuração do manancial superficial. Conseqüentemente, existe uma natural necessidade do homem em conhecer, regulamentar e minimizar os impactos oriundos de suas atividades (AMORIM, 2003).

O monitoramento ambiental é um instrumento de controle e avaliação dos impactos causados pelo homem, que se baseia na resposta integrada de múltiplos parâmetros (físicos, químicos e biológicos). Os dados obtidos no monitoramento subsidiam medidas de planejamento ambiental, controle, recuperação, preservação e conservação do ambiente, bem como auxilia na definição das políticas ambientais (EMCOM AMBIENTAL, 2005).

A avaliação de risco ambiental a partir de bioindicadores é reconhecida como uma técnica de monitoramento ambiental, pois acrescenta informações sobre as respostas biológicas que determinadas espécies (vegetal ou animal) apresentam na presença de poluentes (UNEP, 1991; WHO, 1993). O termo bioindicador trata das espécies, populações ou comunidades que reagem ao efeito da contaminação, alterando seu padrão natural de organização (ADAMS, 2002).

Para Van Gestel e Van Brummelen (1996), o termo bioindicador não deve ser confundido com biomarcador, uma vez que os biomarcadores são as respostas biológicas internas dos organismos expostos aos poluentes, tais como modificações

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).

Os peixes são listados como bons bioindicadores, sendo utilizados amplamente no monitoramento da qualidade da água (FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005). Dentre seus biomarcadores, a taxa de micronúcleos e as aberrações morfológicas nucleares em células de sangue permitem inferir sobre efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos de determinadas substâncias (ROCHA *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010). Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Os bioensaios com plantas superiores também tem sido recomendados para a avaliação, monitoramento e detecção de contaminantes no ambiente (GRANT, 1999). O teste de *Allium cepa* desenvolvido por Levan (1938) é considerado uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas como extratos de plantas, dejetos industriais e, principalmente, águas contaminadas. Este teste é utilizado rotineiramente em todo o mundo, em laboratórios que trabalham com testes de genética toxicológica. É também considerado uma ferramenta valiosa quanto à determinação da contaminação ambiental, havendo extenso banco de dados sobre substâncias químicas já testadas (FISKEJÓ, 1993) sendo inclusive validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

De acordo com as informações supracitadas, verifica-se que os testes de anormalidades nucleares em peixes, bem como o teste do *Allium cepa* são técnicas amplamente utilizadas e que permitem interpretar a contaminação ambiental.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos e mutagênicos das águas do rio Pirapó, região norte do Paraná, a partir do estudo de bioindicadores e biomarcadores ambientais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I - Avaliar a taxa de formação de micronúcleos e aberrações nucleares em eritrócitos de *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) em três pontos do rio Pirapó;

II - Analisar as anormalidades mitóticas, bem como a formação de micronúcleos, em células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* (Magnoliophyta, Alliaceae) em três pontos do rio Pirapó;

III - Comparar as taxas de danos encontradas em ambos os bioindicadores, entre os pontos amostrais.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente. A fonte dessa contaminação é muito diversa, indo desde efluentes industriais, processos de drenagem agrícola (fertilizantes, agrotóxicos), derrames acidentais e não acidentais de resíduos químicos (metais pesados, compostos orgânicos e inorgânicos) a lixo domiciliares que acabam por chegar a rios e mares, gerando a contaminação dos ecossistemas aquáticos (RASHED, 2001).

Os métodos analíticos tradicionais capazes de avaliar poluentes como pesticidas organofosforados e carbamatos em água são realizados por cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou espectrofotometria de massa (MS). No entanto, esses métodos de análise, além de serem muito pontuais, exigem mão de obra especializada e apresentam um alto custo operacional, o que torna inviável sua aplicação em larga escala. Além disso, a poluição ambiental associada ao uso de pesticidas é difícil de ser avaliada (ARIAS *et al.*, 2007).

Neste sentido, em alguns casos, comparativamente aos métodos analíticos de rotina, o uso de bioindicadores e biomarcadores pode consumir menor tempo de análise, requerer menor esforço humano e ser mais econômico (JONSSON; CASTRO, 2005). Além disso, apresentam a vantagem de oferecer informações de efeito ambiental prolongado (LOBO; CALLEGARO; BENDER, 2002).

O teste do micronúcleo é considerado uma técnica que avalia a taxa de micronúcleos e aberrações morfológicas nucleares em peixes, anfíbios, aves e mamíferos. Esta análise é relativamente simples e muito utilizada para verificar a genotoxicidade e mutagenicidade em organismos expostos a substâncias químicas poluentes (xenobiontes) (BOMBAIL; GORDON; BATY, 2001).

Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Os micronúcleos podem aparecer por várias causas, entre elas por falha mitótica, tanto de fragmentos acêntricos de cromossomos, gerados por ruptura (clastogenicidade), quanto de cromossomos completos

(aneuploidia), como consequência, geralmente, de enfermidades genéticas (ARIAS *et al.*, 2007).

Além dos micronúcleos, podem-se observar as aberrações morfológicas nucleares que são formadas quando uma quantidade considerável de material genético fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL; GORDON; BATY, 2001). Ainda, estas aberrações podem estar associadas à desestabilização dos filamentos intermediários da lâmina nuclear.

O teste de *Allium cepa* desenvolvido por Levan (1938) tem sido recomendado para análises de toxicidade ambiental devido a sua elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez e facilidade de manipulação (LEME; MARINMORALES, 2009). Este teste fornece dois tipos de parâmetros para avaliar a toxicidade. Os parâmetros macroscópicos consistem na formação de tumores, avaliação de crescimento de raízes e raízes torcidas, entre outros. Os parâmetros microscópicos consistem na avaliação do índice mitótico e da taxa de formação de micronúcleos. O índice mitótico analisa a taxa de divisão celular e as aberrações cromossômicas (cromossomos em anel, pontes cromossômicas, cromossomos pegajosos, retardos cromossômicos) durante as fases de metáfase e anáfase (MONARCA *et al.*, 2000).

Este teste tem sido validado internacionalmente para mensurar impactos ambientais (EVSEEVA; GERAS'KIN; SHUKTOMOVA, 2003), sendo utilizado como teste preliminar para avaliar o potencial genotóxico e citotóxico de substâncias cancerígenas e como bioindicador de contaminação ambiental (BARBÉRIO *et al.*, 2009).

Com base nestes parâmetros biológicos, o presente trabalho buscou avaliar a qualidade ambiental das águas do rio Pirapó, região norte do Paraná.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO

A Bacia Hidrográfica do Pirapó possui uma área total de 5.098,10 km<sup>2</sup> e uma população de aproximadamente, 500.000 habitantes. O rio Pirapó nasce no município de Apucarana e escoia 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 (SEMA, 2010).

Os pontos amostrais do presente trabalho foram distribuídos ao longo do rio Pirapó de acordo com o nível de interferência antrópica (figura 1):

Ponto Montante – localizado nas cabeceiras do rio Pirapó, em Apucarana nas coordenadas latitude 23°30'39,05"S e longitude 51°29'44,55"O, sendo o local mais preservado, com mata ciliar estabelecida e boa cobertura vegetal;

Ponto Intermediário – situado em Maringá, depois da captação de água para o abastecimento público nas coordenadas latitude 23°18'16,86"S e longitude 51°51'36,69"O caracterizado por intensa atividade agrícola e industrial;

Ponto Jusante – situado em Maringá, após o lançamento dos efluentes da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) nas coordenadas latitude 23°17'13,42"S e longitude 51°55'25,64"O (figura 2).

Os pontos amostrais possuem características distintas e as condições do local de coleta estão demonstradas na (figura 2).



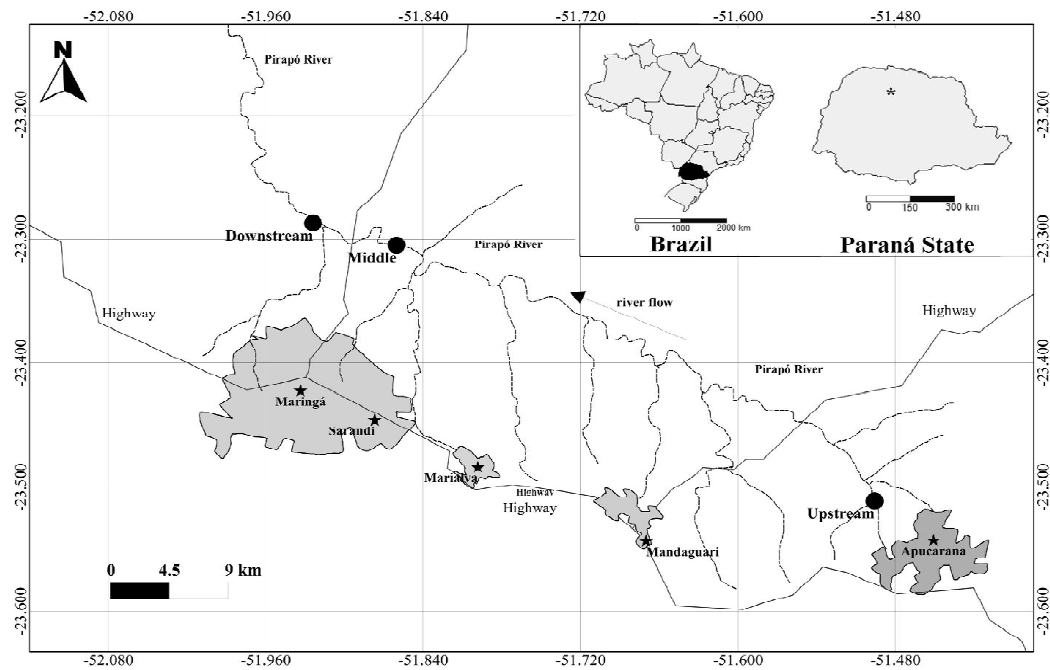


Figura 1: Área de coleta no norte do estado do Paraná, Brasil. Upstream: ponto a montante, a oeste de Apucarana; Middle: ponto intermediário, a nordeste de Maringá; Downstream: ponto a jusante, norte de Maringá. Fonte: O autor.



Figura 2: 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. Fonte: O autor.

#### 4.2 ESPÉCIES BIOINDICADORAS

A espécie de peixe bioindicadora é o cascudo *Hypostomus ancistroides* (Ihering 1911), que apresenta elevada frequência no rio Pirapó, fornecendo um bom

número amostral, facilidade de manuseio, além do seu potencial bioindicador. Esta espécie apresenta uma dieta predominantemente detritívora (BONATO; ARAUJO; DELARIVA, 2008), sendo considerada de hábito sésil (figura 3).



Figura 3: Exemplar do bioindicador estudado, *Hypostomus ancistroides*, capturado no rio Pirapó. Fonte: O autor.

Além de peixe, o presente trabalho utilizou a espécie vegetal *Allium cepa* (cebola) em bioensaios com a água do rio Pirapó para avaliar as suas alterações cromossômicas. Esta espécie foi escolhida devido a sua ampla aceitação na comunidade científica, sendo inclusive validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), pelo seu baixo custo, alta confiabilidade, facilidade e concordância com outros testes (figura 4).



Figura 4: Exemplares de *Allium cepa*, espécie escolhida para os bioensaios e submetida aos tratamentos. Fonte: O autor.

### 4.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL

#### 4.3.1 *Hypostomus ancistroides*

Foram realizadas duas coletas de peixes nos três pontos amostrais anteriormente descritos, sendo uma no verão (janeiro) e outra no inverno (julho/agosto) de 2013. Capturou-se, aproximadamente, 20 indivíduos de *Hypostomus ancistroides* por ponto amostral e estação do ano.

Para captura dos indivíduos utilizamos seis redes de espera, das quais quatro apresentam 5 m de comprimento X 1,2 m de altura e malha de 1,5 cm entre nós opostos. As duas redes restantes apresentam 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 atingirmos aproximadamente 20 exemplares.

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

Para a coleta de sangue, fez-se uma punção cardíaca, em cada indivíduo, com o auxílio de uma seringa de insulina previamente heparinizada. A amostra de sangue foi colocada em uma lâmina de microscopia, onde empregou-se a técnica de Heddle, (1973) e Schmid (1975), que consiste, na realização de um esfregaço de sangue de cada indivíduo em uma lâmina e posterior coloração com Giemsa a 10% (figura 5). Após a coloração, fez-se a contagem de 1000 células de sangue por lâmina, em teste cego, com auxílio de um microscópio de luz, com a objetiva de 100x e óleo de imersão, buscando-se visualizar os micronúcleos e as aberrações morfológicas nucleares. Foram consideradas aptas à contagem, as células que apresentavam integridade da membrana citoplasmática e que não estavam sobrepostas com outras células.

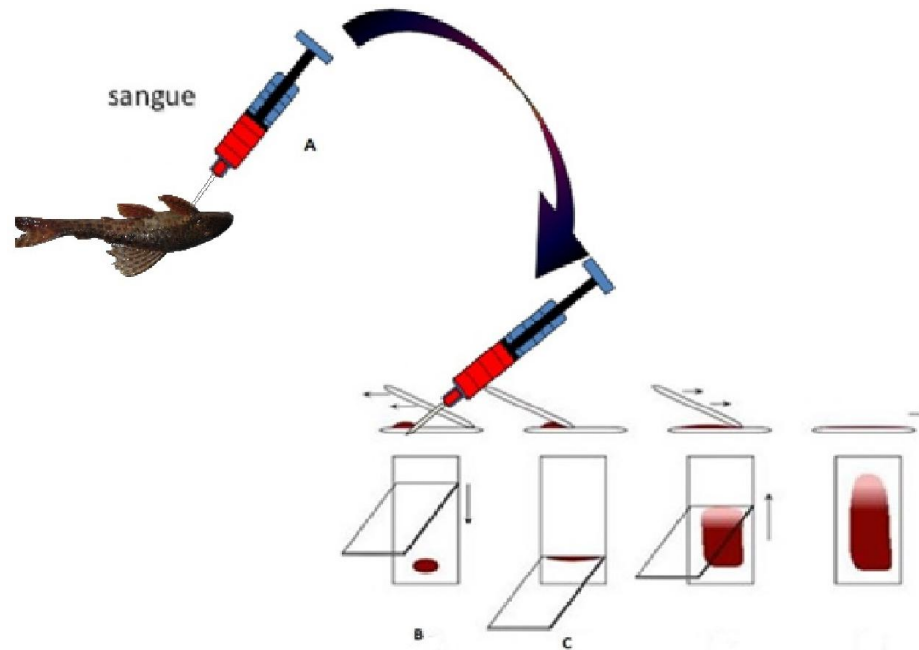


Figura 5: Método de confecção de lâminas para o teste do micronúcleo pisce realizando o esfregaço de sangue, as letras indicam os seguintes passos: A – Realização da punção cardíaca nos indivíduos; B – Uma gota de sangue dos indivíduos é colocada na lâmina; C – Com o auxílio de uma lâmina é realizado o esfregaço. Fonte: Adaptado de (MARION, 2012).

Os tipos de danos foram quantificados, em separado, de acordo com a descrição de Carrasco; Tilbury; Myers (1990) (figura 6):

- a) Bolha (*Blebbled*): núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). Os tamanhos destas evaginações situam-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) Lobado (*Lobed*): núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *blebbled*. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) Vacuolizado (*Vacuolated*): núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) Entalhado (*Notched*): núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes

parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envoltório nuclear.

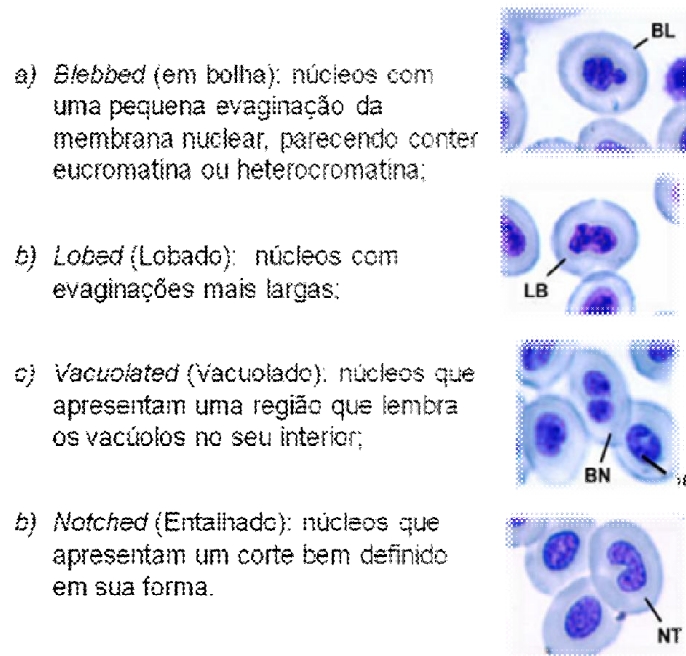


Figura 6: Alterações celulares que podem ser encontradas em eritrócitos de peixes durante a realização do teste cego em células já coradas com guiemsa 10%, envolvendo o teste do micronúcleo pisceo. Fonte: JIRAUNGKOORSKUL; SAHAPHONG (2007).

#### 4.3.2 *Allium cepa*

Em fevereiro de 2014 foram coletadas amostras de água do rio Pirapó, nos mesmos três pontos amostrais dos peixes, para a realização dos bioensaios com *Allium cepa*.

Para coletar a água utilizou-se um frasco de vidro na cor âmbar emergindo-o a aproximadamente 30 cm de profundidade no sentido contrário a corrente do rio. Foi coletado em torno de 1 litro de água por ponto amostral. A amostra foi armazenada em uma caixa de poliestireno com gelo para o transporte até o laboratório.

Em cada ponto amostral fez-se a tomada de dados abióticos com uma sonda multiparamétrica marca YSI modelo 650 MD. Os parâmetros mensurados foram:

temperatura, condutividade, salinidade, pH, potencial de oxirredução, turbidez, oxigênio dissolvido e pressão barométrica.

Em laboratório realizou-se um estímulo prévio para desenvolvimento radicular em 25 exemplares de bulbos de *A. cepa*, através da imersão da sua base em água destilada por 24 horas, até que as raízes atingiram 0,5 cm. Depois deste período, os exemplares foram alocados aleatoriamente nos seus respectivos tratamentos, onde permaneceram por 72h. Além dos três tratamentos efetuados com as águas do rio Pirapó (montante, intermediário e jusante), foram realizados tratamentos controles: negativo em água destilada, e positivo em solução de colchicina  $0,75 \times 10^{-4}\%$ . Foram alocados cinco indivíduos em cada tratamento.

As pontas meristemáticas das raízes dos bulbos foram fixadas com Carnoy (3 álcool: 1 ácido acético) por um período de 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as raízes foram transferidas para álcool 70% por 24 horas, banhadas novamente em álcool 70% e alocadas na geladeira. Para a elaboração das lâminas efetuou-se as seguintes etapas (figura 6):

1. Lavagem das raízes em água destilada;
2. Hidrólise com HCl 1N por 10 minutos;
3. Nova lavagem das raízes com água destilada;
4. Coloração com Carmin acético 1% por 40 min;
5. Banho com água destilada, por gotejamento;
6. Seleção das regiões meristemáticas em lâmina, utilizando-se pinça, bisturi e agulha;
7. Recoloração com Carmin acético 1%;
8. Inserção da lamínula sobre o material;
9. Leve esmagamento dos meristemas;
10. Vedação da lâmina com esmalte incolor.

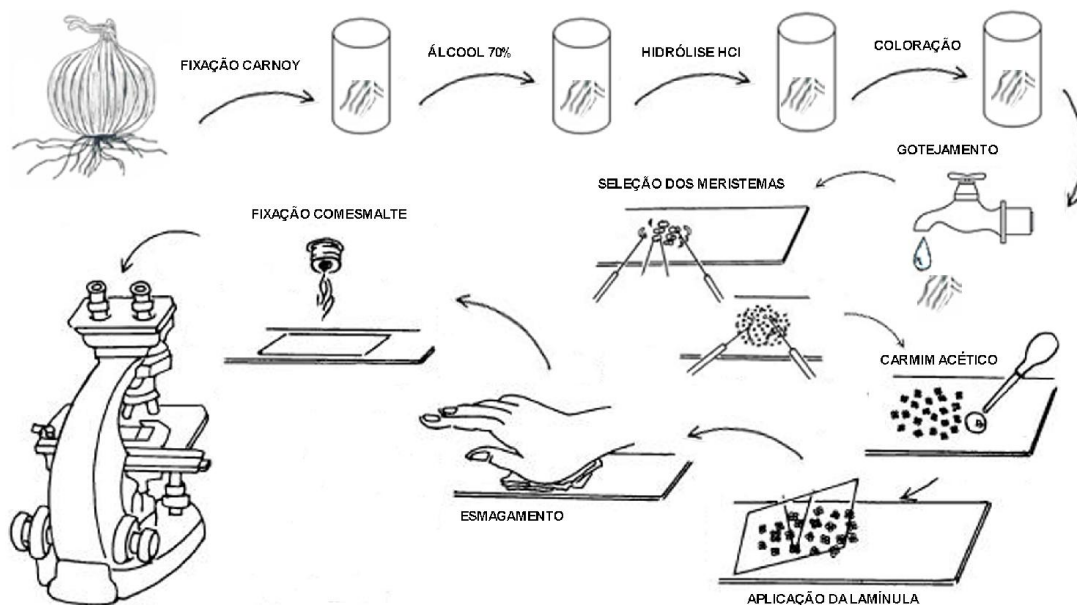


Figura 7: Ilustração do procedimento de confecção de lâminas para o teste de *A. cepa*. Fonte: Adaptado de (BARBÉRIO, 2013).

Após a confecção das lâminas, fez-se a análise qualitativa das células em microscópio de luz, para avaliar as seguintes anormalidades: cromossomos em anel, pontes anafásicas, cromossomos pegajosos, retardos cromossômicos, micronúcleos e alterações morfológicas nucleares.

#### 4.4 ANÁLISE DE DADOS

Para *Hypostomos ancistroides* foi realizada a análise de frequência percentual dos tipos de danos em relação ao ponto amostral e a estação do ano. Esta análise permite avaliar variações espaciais e/ou temporais dos tipos de danos, relacionando-os aos poluentes.

Além desta, foi realizada a quantificação total de danos a partir da soma do número de micronúcleos com as aberrações morfológicas nucleares. Com posse desta informação, procedeu-se o tratamento estatístico a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni. Estes testes foram aplicados somente após a checagem da normalidade residual e da homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene,

respectivamente. A ausência de normalidade associada a presença de homocedasticidade leva a utilização dos testes supracitados (QUINN & KEOUGH, 2002). Todos os testes foram realizados com o *software* STATISTICA<sup>®</sup> 8.0.

Para *Allium cepa* fez-se apenas uma análise qualitativa com uso de microscopia de luz.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Hypostomus ancistroides*

Capturou-se um total de 123 exemplares da espécie *Hypostomus ancistroides*, dos quais 65 pertenceram à coleta realizada no verão e 58 foram referentes à coleta efetuada no inverno. Na coleta de verão, 25 peixes foram capturados no ponto a montante, 19 no ponto intermediário e 21 no ponto a jusante. No inverno foram capturados 18 exemplares no ponto montante e 20 nos pontos intermediário e jusante.

Ao observar as células de sangue dos indivíduos, constatou-se a presença de alterações morfológicas nucleares (citotoxicidade) e micronúcleos (genotoxicidade) (figura 7). A partir da análise da frequência percentual dos tipos de danos, constatou-se que no verão ocorreu um predomínio de células lobadas e entalhadas como alterações mais recorrentes. Já nos exemplares do inverno, a alteração mais recorrente foi a célula com bolha, seguida da célula entalhada. Para ambas as estações foram registrados micronúcleos, sendo este dano mais freqüente na coleta de verão, atingindo 2,4% - 4,2% das células quantificadas (figura 8).

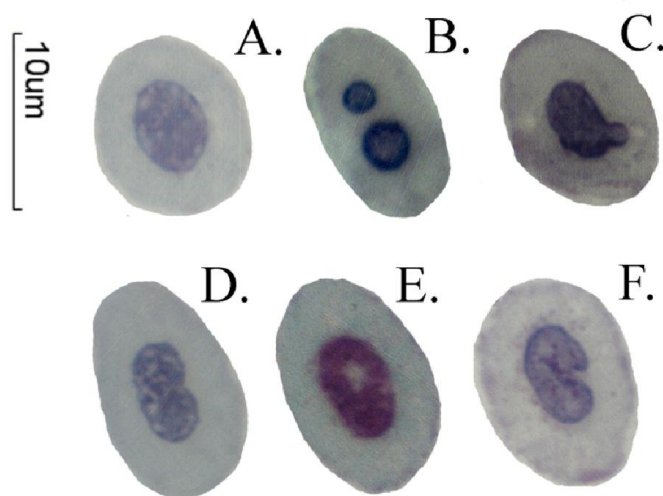


Figura 8: Prancha com tipos de alterações morfológicas nucleares encontradas em eritrócitos de *H. ancistroides*, capturados no rio Pirapó. (A.) núcleo normal; (B.) célula com micronúcleo; (C.) núcleo com bolha; (D, F.) núcleo entalhado; (E.) núcleo vacuolizado. Fonte: O autor.

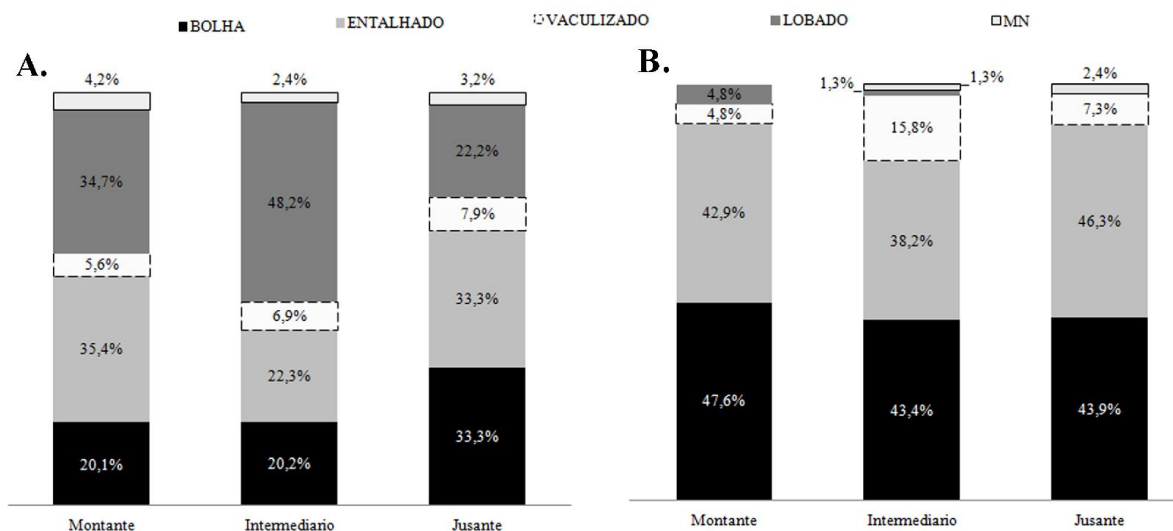


Figura 9: Resultados do teste de alterações morfológicas nucleares de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Pirapó (A.) coleta de verão (B.) coleta de inverno. Fonte: O autor.

A partir do teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni, constatou-se que os peixes coletados no verão apresentaram maior taxa de dano nuclear no ponto intermediário seguido pelo ponto a jusante ( $H_{2,65} = 11,54$ ;  $p < 0,05$ ) (tabela 1, figura 9A).

Tabela 1 – Valores obtidos através do teste de Kruskal Wallis com os dados de anormalidades nucleares de *H. ancistroides* nos pontos amostrais. \* indicam os valores significativos ( $p < 0,05$ ).

$H_{2,65} = 11,54$ ;  $p = 0,004$

Tratamentos	Montante	Intermediário	Jusante
<b>Montante</b>	-----		
<b>Intermediário</b>	0,011*	-----	
<b>Jusante</b>	0,020*	0,063	-----

Fonte: O autor.

Utilizando-se dos mesmos testes estatísticos verificou-se que os peixes capturados no inverno apresentaram maior taxa de dano nuclear no ponto intermediário seguido pelo ponto a montante ( $H_{2,58} = 16,16$ ;  $p < 0,05$ ) (tabela 2, figura 9B).

Tabela 2 – Valores obtidos através do teste de Kruskal Wallis com os dados de anormalidades nucleares de *H. ancistroides* nos pontos amostrais. \* indicam os valores significativos ( $p < 0,05$ ).

$$H_{2,58} = 16,16; p = 0,0003$$

Tratamentos	Montante	Intermediário	Jusante
Montante	-----		
Intermediário	0,293	-----	
Jusante	0,058	0,00028*	-----

Fonte: O autor.

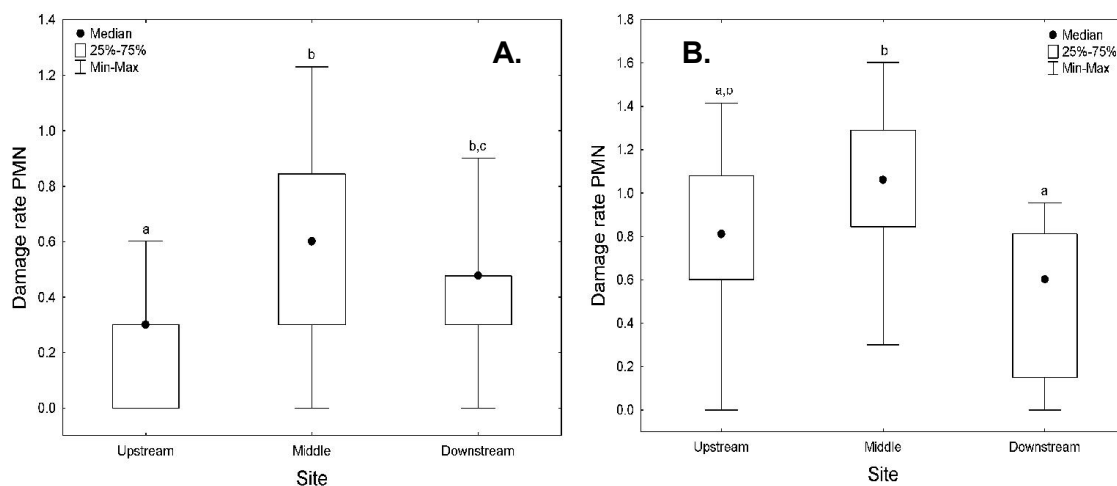


Figura 10: Resultados para teste do micronúcleo de *Hypostomus ancistroides* coletados no rio Pirapó (A.) durante o verão (B.) durante o inverno, a montante (Upstream), a ponto intermediário (Middle), a jusante (Downstream). Letras diferentes (a, b e c) correspondem diferença significativa no teste post hoc de Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ . Fonte: O autor.

## 5.2 *Allium cepa*

Os parâmetros abióticos obtidos através da sonda multiparamétrica também evidenciaram que o ponto intermediário é o mais alterado. Os valores de pH, turbidez e oxigênio dissolvido foram os que mais destoaram dos demais pontos, como se pode observar na tabela 3.

Tabela 3 – Dados abióticos da água obtidos nos pontos de coleta. ORP: Potencial de Oxirredução. OD: Oxigênio Dissolvido. Baros: Pressão Barométrica. mV: milivolts. NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez.

<b>Parâmetros</b>	<b>Ponto Montante</b>	<b>Ponto Intermediário</b>	<b>Ponto Jusante</b>
<b>Temperatura °C</b>	20,04	27,41	27,34
<b>Condutividade <math>\mu\text{S}/\text{cm}</math></b>	102	146	186
<b>Sal ppt</b>	0,00	0,01	0,01
<b>pH</b>	7,76	8,04	7,79
<b>pH mV</b>	-52,1	-67,8	-54,6
<b>ORP mV</b>	135,7	133,9	120,2
<b>Turbidez NTU</b>	5,4	88,5	56,1
<b>OD %</b>	89,9	62,6	80,6
<b>OD mg/L</b>	8,16	4,95	6,38
<b>Baros mmHg</b>	719,1	740,4	740,2

Fonte: O autor.

Foram utilizados 25 exemplares de *A. cepa* para realização do presente trabalho, cinco bulbos para cada tratamento. No entanto, apenas 13 bulbos apresentaram crescimento de seus meristemas radiculares, sendo distribuídos nos tratamentos da seguinte maneira:

Controle negativo = 2;

Controle positivo = 2;

Tratamento montante = 3;

Tratamento intermediário = 3;

Tratamento jusante = 3.

A partir de análises em microscópio de luz, observaram-se todas as fases de divisão mitótica, bem como um conjunto de alterações, tais como a presença de bolhas nucleares, micronúcleos, cromossomos retardados e pontes anafásicas (figura 10). Vale ressaltar que todas as alterações foram obtidas apenas nas lâminas do tratamento intermediário. O controle positivo foi o tratamento com maior ocorrência de células em divisão. É importante relatar que o baixo número de réplicas por tratamento inviabilizou as análises quantitativas e estatísticas.

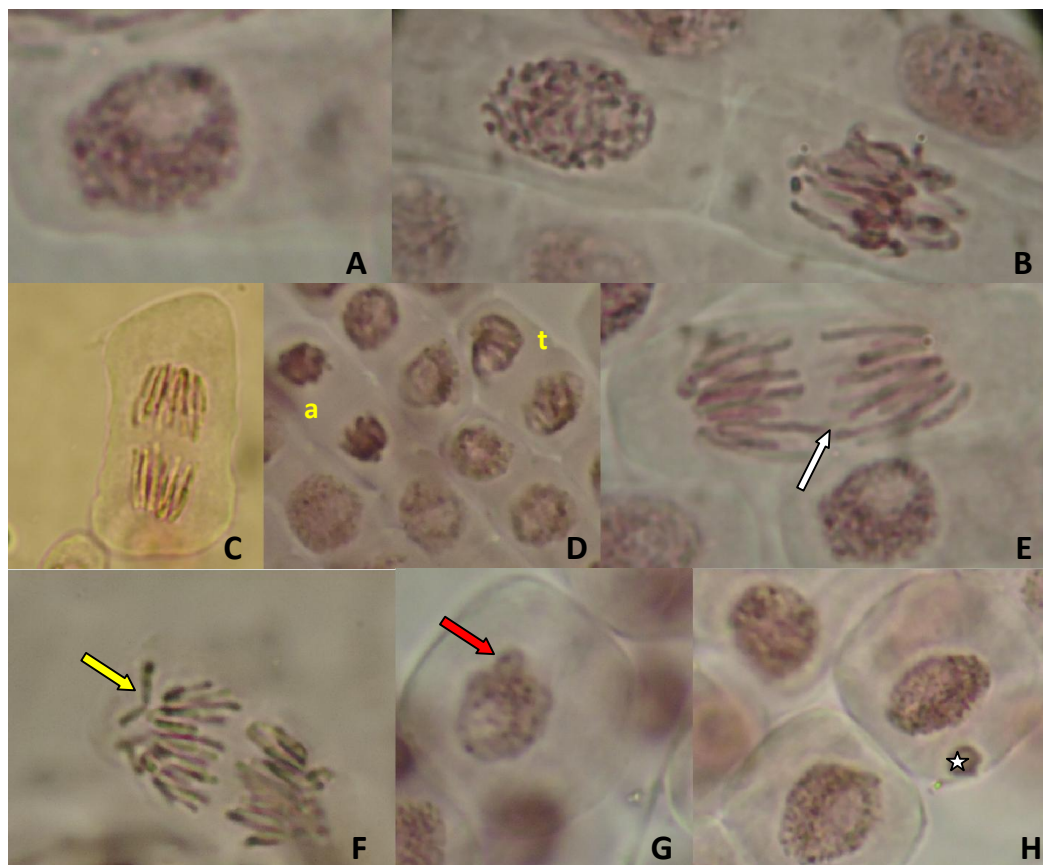


Figura 11: Fotomicrografias das células do meristema radicular de *Allium cepa*, em coloração Carmin acético 1%. A – célula em interfase (objetiva = 100X); B – células em prófase e metáfase (objetiva = 100X); C – célula em anáfase (objetiva = 40X); D – células em anáfase (a) e telófase (t) (objetiva = 40X); E – célula em anáfase, com uma ponte anafásica (seta branca; objetiva = 100X); F – célula em anáfase, com um cromossomo retardado (seta amarela; objetiva = 100X); G – célula em interfase, com uma bolha no núcleo (seta vermelha; objetiva 40X); H – célula em interfase, com um micronúcleo (estrela; objetiva = 40X). Fonte: O autor.

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito mutagênico e citotóxico das águas do rio Pirapó, região norte do Paraná, a partir do estudo com bioindicadores ambientais. Obteve-se como resultado uma elevada taxa de alterações morfológicas nucleares nos peixes coletados no ponto intermediário para ambas as estações do ano. A esse resultado atribui-se a influência antrópica sobre o local, que sofre com a intensiva atividade agrícola e com o lançamento inadequado de resíduos industriais. Os dados abióticos pontuais aliados às análises qualitativas do bioensaio com *Allium cepa* corroboram estas afirmações.

Neste sentido, o trabalho de Talapatra e Banerjee (2007) mostraram que os peixes que residem e se alimentam em corpos hídricos poluídos, tais como espécies sésseis, desenvolvem altas taxas de anormalidades nucleares, células necróticas e apoptóticas. Aliado a isso, o posicionamento trófico ocupado pela espécie no habitat influencia o número basal de micronúcleos (PORTO; ARAUJO; FELDBERG., 2005), sendo um provável efeito do processo de bioacumulação ao logo da cadeia trófica. A espécie bioindicadora estudada neste trabalho, *Hypostomus ancistroides*, revela características autoecológicas propensas à bioacumulação, uma vez que possui dieta predominantemente detritívora (BONATO; ARAUJO; DELARIVA, 2008) e apresenta um comportamento de guarda não migratória e ninho (SUZUKI; AGOSTINHO; WINEMILLER, 2000).

A natureza da espécie *H. ancistroides* permite avaliar com um elevado grau de confiabilidade os impactos ambientais presentes nos pontos amostrais do rio Pirapó. Próximo ao ponto intermediário, mais afetado, encontra-se uma grande área de influência agrícola, com pouca ou nenhuma vegetação ciliar, e a presença de indústrias, que podem despejar de maneira inadequada seus efluentes no rio.

Mais precisamente a montante do ponto intermediário situa-se uma fábrica de gelatina e uma indústria de fertilizantes. Segundo Abreu (1998) a indústria de gelatina gera resíduos bastante complexos, conferindo ao efluente alta carga orgânica além de sulfetos e material graxo, tornando difícil o tratamento do resíduo. O mesmo pode se dizer das indústrias de fertilizante, um dos poluentes mais característicos dessas indústrias são os fluoretos, que são lançados no ambiente em concentrações significativas alterando a composição química dos sistemas naturais,

podendo causar danos aos animais, plantas e ao homem (MANAHAN, 1993; O'NEIL, 1993). Ainda pode-se relacionar a influência antrópica constatada no ponto intermediário com a ocupação agrícola a qual utiliza produtos causadores de desequilíbrio ambiental como herbicidas inseticidas, fungicidas, além de fertilizantes e sais (EMBRAPA, 2010).

No presente estudo, principalmente no ponto intermediário, foram observadas a presença de alterações morfológicas nucleares (diversas formas) e micronúcleos. Acredita-se que as anomalias morfológicas nucleares aconteçam devido a problemas com a *lâmina*, uma proteína do núcleo que confere o formato oval regular e a estabilidade nuclear (ALBERTS *et al.*, 1997; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000). Desta maneira estas anomalias caracterizam-se, como uma alteração citotóxica. Já os micronúcleos indicam efeitos de mutagenicidade, visto que durante a anáfase, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos podem não ser transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos, devido a algum erro de divisão (SCHMID, 1975).

Carrasco, Tilbury e Myers, (1990) fotografaram e quantificaram os micronúcleos encontrados em seu trabalho, como as alterações morfológicas nucleares. As mesmas alterações foram localizadas e quantificadas neste trabalho, sendo detectado um maior número de alterações no verão. Este resultado pode ter ocorrido devido ao maior volume de chuvas da estação associado ao período de intensiva atividade agrícola, bem como, o elevado despejo de efluentes industriais. Estes fatores podem ter carregado um maior volume de xenobiontes ao corpo receptor e causado as maiores alterações nesta estação.

Na coleta de verão, ainda, registrou-se um predomínio de células lobadas e entalhadas como as alterações mais frequentes, enquanto que o inverno apresentou maiores números de células com bolha e lobada. Existe a hipótese de que alterações bolhas e lobadas lembram estruturas encontradas em eritrócitos de sangue periférico, oriundos de exemplares com anemia induzida pela ausência da vitamina B12 ou por deficiência de ácido fólico (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990). Esta argumentação pode se basear no fato do inverno ser uma estação de temperaturas amenas, menor produtividade e velocidade de ciclagem de nutrientes, afetando as espécies. Por outro lado, pode ser que os poluentes estejam afetando a alimentação e absorção de nutrientes pelos peixes.

Os parâmetros abióticos são importantes para caracterizar um ambiente, mas tornam-se muito inespecíficos para avaliar a poluição em corpos hídricos lóticos e por isso precisam ser analisados com muito cuidado. Assim, é importante avaliá-los juntamente com parâmetros biológicos (biomarcadores) para oferecerem maior confiabilidade nas informações de efeitos ambientais prolongados (LOBO; CALLEGARO; BENDER, 2002).

Os resultados da análise abiótica apresentaram diferenças entre os pontos analisados, destacando-se a concentração de oxigênio dissolvido no ponto intermediário, que estava abaixo dos limites estabelecidos pela Resolução Conama n° 357/2005 (BRASIL 2005) para corpos de água doce de Classe II (OD não inferior a 5 mg/L para qualquer amostra). As demais diferenças estão relacionadas ao pH e a turbidez porém nenhum desses parâmetros ultrapassaram os limites.

O oxigênio dissolvido (OD) é de essencial importância para os organismos aeróbios. Durante a estabilização da matéria orgânica, as bactérias fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, podendo vir a causar uma redução da concentração do mesmo no meio. O oxigênio dissolvido é o principal parâmetro para caracterização dos efeitos da poluição das águas por despejos orgânicos (VONSPERLING, 1996). Provavelmente, a característica dos efluentes lançados próximos ao ponto e a lixiviação de fertilizantes proveniente da agricultura desenvolvida no entorno expliquem os resultados vistos no ponto intermediário.

O trabalho de Alves *et al.*, (2008) avaliou a qualidade da água na bacia do rio Pirapó, por meio de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos, encontrando alterações significativas nas águas deste rio, principalmente naqueles locais próximos ao ponto intermediário e jusante do presente trabalho. Segundo o autor a água estava imprópria para tratamento convencional, enquadrando-se como pertencente a Classe IV, e se não fossem tomadas ações urgentes, a limitação das águas do manancial seria inevitável.

O teste biológico com *Allium cepa*, em concordância com os demais resultados, revelou danos no ponto intermediário. Embora a toxicidade não tenha sido testada via tratamento estatístico, devido ao baixo número amostral, pode-se observar a presença de alterações morfológicas que caracterizam a genotoxicidade do local.

As anormalidades cromossômicas em células de *Allium cepa* são parâmetros eficientes para a investigação do potencial genotóxico de águas contaminadas, pois



fornecem informações importantes que devem ser consideradas no biomonitoramento ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Assim, não é possível contestar a confiabilidade do teste, porém problemas na metodologia, como o não crescimento das raízes de alguns bulbos impossibilitaram um resultado mais robusto.

## 7 CONCLUSÃO

Os bioindicadores escolhidos neste trabalho mostraram-se capazes de expressar os efeitos da contaminação ambiental. O teste de aberrações nucleares apresentou resultados interessantes, demonstrando diferenças significativas entre os pontos amostrais escolhidos.

O elevado número de alterações cromossômicas, bem como de alterações nucleares encontradas em indivíduos de *Hypostomus ancistroides* sugerem que o rio Pirapó sofre forte influência antrópica. As substâncias xenobioticas presentes no ponto intermediário parecem muito mais citotóxicas e genotóxicas que nos demais pontos. O resultado do teste biológico com células meristemáticas de *Allium cepa* e os dados pontuais abióticos corroboram com esta informação.

Sugere-se o uso de mais biomarcadores ou a implementação de outras análises, parâmetros físicos e químicos da água que identifiquem classes químicas de determinados compostos orgânicos presentes em efluentes industriais e agrícolas. Visto que o rio Pirapó abastece a cidade de Maringá e todas as cidades do entorno o estudo revela preocupante potencial de contaminação das águas, podendo tornar-se inviável para abastecimento público.

## REFERENCIAS

ABREU, Elenice T. **Tratamento de efluentes de indústria de gelatina em biorreator com membrana**. 1998. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá. 1998.

ADAMS, Sidney M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Americas Fishers Society**, v. 3, p. 104-112, 2002.

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

ALVES, Eliane C.; SILVA, César F.; COSSICH, Eneida S.; TAVARES, Célia R. G.; FILHO, Edvard E. 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**, Maringá, v. 30, n. 1, 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.

ARIAS, Ana R. L.; BUSS, Daniel F.; ALBUQUERQUE, Carla; INÁCIO, Alan F.; FREIRE, Marina M.; EGLER, Mariana; MUGNAI, Riccardo; BAPTISTA, Darcilio F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n.1, p. 61-72, 2007.

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

BARBOSA, Jefferson. S., CABRAL, Thiago. M. FERREIRA, Douglnilson. M., AGNEZ-LIMA, Lucymara. F. BATISTUZZO DE MEDEIRS, Silvia. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320-325, 2010.

BARBÉRIO, Agnes; BARROS, Layra; VOLTOLINI, Julio C.; MELLO, Maria L. S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do

Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 3, p. 837-842, 2009.

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

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**. IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar, Maringá, 2008.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre uma nova classificação para as águas doces, bem como para as águas salobras e salinas do território nacional. Brasília: Conama, 2005.

CABRERA, Guillermo L., RODRIGUES, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, n° 426, p. 211-214, 1999.

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

DERÍSIO, José. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental**. São Paulo: CETESB, 1992.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Impactos ambientais das atividades agrícolas**. 2010. Disponível em: <[www.cana.cnpm.embrapa.br/espec.html](http://www.cana.cnpm.embrapa.br/espec.html)>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2014.

EMCON AMBIENTAL. **Empresa de Consultoria Ambiental**. Monitoramento. 2005. Disponível em: <<http://www.emconambiental.com.br/projetos3.htm>>. Acesso em: 04 jul 2013.

EVSEEVA, Tatiana I.; GERAS´KIN, Stanislav A.; SHUKTOMOVA, Ida I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v. 68, p.235-248, 2003.

FISKESJÓ, Geirid. Allium test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology and Water Quality**, Nova Iorque, v. 8, n. 4, p.461–470, 1993.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, n° 455. p.81-95, 2000.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, Antônio. The use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 12, p. 67-86, 2005.

GRAÇA, Weferson J.; PAVANELLI, Carla S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. EDUEM, Maringá. 241p. 2007.

GRANT, William F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

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

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

JONSSON, Cláudio M.; CASTRO, Vera L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. **Agência de informação Embrapa – Agricultura e Meio ambiente**, Jaguariúna, out. 2005. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Jonsson\\_Castro\\_biomarcadores1D-U4Vhi5C93K.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Jonsson_Castro_biomarcadores1D-U4Vhi5C93K.pdf)>. Acesso em: 01 out. 2013.

LEME, Daniela M.; MARIN-MORALES, Maria A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEVAN, Albert. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas, Lund**, v. 24, n. 4 p. 471-486, 1938. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x/pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2013.

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

MANAHAN, Stanley.E. **Fundamentals of Environmental Chemistry.** Lewis Publishers. 1993

MARION Luis F. **O uso de biomarcadores genéticos em *Astyanax aff. paranae* (pisces) para avaliar a contaminação aquática na região centro-oeste do Paraná.** 2012. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012.

MONARCA, Silvano.; FERETTI, Donatella.; COLLIVIGNARELLI, Carlo.; GUZZELA, Licia.; ZERBINI, Ilaria.; BERTANZA, Giorgio E.; PEDRAZZANI, Roberta. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, Londres, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

O'NEILL, Paruelo. **Environmental Chemistry.** Chapman & Hall. 2ed. 1993.

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.

PORTO, Jorge. I. R. ARAUJO, Cleusa. S. O. FELDBERG, Eliana. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292. 2005.

QUINN Gerry P. KEOUGH Michael J. **Experimental design and data analysis for biologists.** Cambridge. New York. 537 p., 2002.

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

RIBEIRO, Lucia R., SALVADORI, Daisy M. F., MARQUES, Edmundo K. **Mutagênese Ambiental.** Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356 p., 2003.

ROCHA, Paula S., LUVIZOTTO, George L., KOSMEHL, Thomas., BÖTTCHER, Melanie., STORCH, Volker., BRAUNBECK, Thomas. & HOLLERT, Henner. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72: 1842-1848, 2009.

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

SEMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. **Bacias Hidrográficas do Paraná – Série Histórica**, Curitiba, 2010.

SUZUKI Harumi I, AGOSTINHO Angelo A, WINEMILLER Kirk O. Relação entre a morfologia do oócito e estratégia reprodutiva de cascudos do rio Paraná, Brasil. **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 791-807, 2000.

TALAPATRA Sandeep N, BANERJEE Sudip K. Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the Gill and kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farms. **Food Chemicals Toxicology**, v. 45, p. 210-215.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME – UNEP/IOC/ICES. Review of contaminants in marine mammals. **Marine Mammal Technical Report**, n. 2, p. 23, 1991.

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.

VON SPERLING, Marcos. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Program on Chemical Safety (IPCS)**. Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva, 1993.