

LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI

**BIOMONITORAMENTO DO RIO IGUAÇU EM DOIS PONTOS
UTILIZANDO COMO BIOINDICADOR PEIXES DO GÊNERO
Astyanax (Characiforme, Characidae).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada junto
à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do
curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

**CURITIBA
2008**

LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI

**BIOMONITORAMENTO DO RIO IGUAÇU EM DOIS PONTOS UTILIZANDO COMO
BIOINDICADOR PEIXES DO GÊNERO *Astyanax* (Characiforme, Characidae).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada junto à disciplina de Estágio em Genética (BG 016), do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: **Profa. Dra. Marta Margarete Cestari**

**CURITIBA
2008**

Dedico este trabalho a meus pais, que tornaram tudo isso possível...

AGRADECIMENTOS

À professora Marta Margarete Cestari pela sua confiança, ensinamentos e dedicação a esse trabalho. Principalmente a amizade cultivada nesses anos.

Ao Marcos por todo ensinamento, grande amizade e paciência, tão necessária.

A Wanessa, por ser uma amiga tão especial e por todos os cafés na cantina. Ah sim, obrigado também por todo ensinamento, orientação e ajuda.

A toda a equipe que participou das coletas: Vinicius, Chuli, Flávio, Margarete, Gi, Juliana, Jean, Leo e Viviane.

A dona Salete Kotowski e sua filha Marina, pelo empréstimo do local de trabalho em Irineópolis. Obrigado por tudo!!!

A todos do Laboratório de Citogenética animal: Cabelo, Fucão, Rafa, Charuto, Balen, Gi, Thaís, Cristina e Áurea. Em especial, à equipe da mutagênese ambiental: Marcos, Wane, Taynah, Nédia, Gabi e Paula.

A todos os meus amigos da graduação, cujo companheirismo é essencial para mim.

Em especial ao Marcel, Flávio Kozovo, Cabelo, Fucão, David, Elisando, Milico, Padre, Japa, Charuto, Schuh, Rui e Flávio.

As minhas queridas amigas Karine, Carol, Carla, Dani, Nédia, Silvia, Mel, Paty, Rafinha, Malu, Evelise, Alê, Carlinha, Vanessa, Kami e Carine.

A minha família, por todo carinho e apoio em todas as horas. Principalmente aos meus pais, pelo amor incondicional e todo o suporte dado.

A pessoa mais especial que já conheci, Karina. Você é tudo pra mim.

Em memória, agradeço a minhas tias Eloí de Lourdes e Irenita. Amo muito vocês.

“Três anéis para os Reis-Elfos sob este céu,
Sete para os Senhores-Anões em seus rochosos corredores,
Nove para Homens Mortais, fadados ao eterno sono,
Um para o Senhor do Escuro em seu escuro trono
Na Terra de Mordor onde as Sombras se deitam.
Um anel para a todos governar, Um anel para encontrá-los,
Um anel para a todos trazer e na escuridão aprisioná-los
Na Terra de Mordor onde as sombras se deitam.”

(J. R. R. Tolkien)

SUMÁRIO

RESUMO	i
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL.....	5
2.2 PEIXES EM BIOMONITORAMENTOS.....	6
2.3 TESTE DO MICRONÚCLEO PISCEO	8
2.4 ENSAIO COMETA.....	9
3 OBJETIVOS	11
3.1 OBJETIVO GERAL.....	11
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 ORGANISMO UTILIZADO	12
4.2 LOCAIS DE COLETA.....	13
4.2.1 IRINEÓPOLIS – SC.....	13
4.2.2 PORTO AMAZONAS - PR	14
4.2.3 PARQUE ECOLÓGICO COSTA.....	15
4.3 METODOLOGIA.....	17
4.3.1 COLETAS	17
4.3.2 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO.....	17
4.3.3 ENSAIO COMETA.....	18
4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5 RESULTADOS	22
5.1 COLETA DE ABRIL DE 2008.....	22
5.1.1 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	22
5.1.2 ENSAIO COMETA.....	24
5.2 COLETA DE OUTUBRO DE 2008	25
5.2.1 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES.....	25
5.2.2 ENSAIO COMETA.....	26
5.3 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS COLETAS	28
5.3.1 IRINEÓPOLIS.....	28
5.3.2 PORTO AMAZONAS	29
6 DISCUSSÃO.....	30
7 CONCLUSÕES.....	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

A Bacia do Iguaçu é a maior do Estado do Paraná e pertence ao sistema hidrográfico do rio Paraná, apresenta as Cataratas do Iguaçu como barreira natural e um alto grau de endemismo. A bacia do rio Iguaçu possui pequeno número de espécies de peixes quando comparada com outros rios da bacia do Paraná. Os exemplares utilizados no presente trabalho foram do gênero *Astyanax* (lambaris), peixes de pequeno porte e hábitos nectônicos (coluna d'água). Biomarcadores genéticos avaliam alterações no DNA que podem implicar em risco de vida e de reprodução para as espécies estudadas, bem como para as populações e o ecossistema. O objetivo deste trabalho foi avaliar em duas estações distintas, através da aplicação do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo Písceo em eritrócitos de lambaris, a qualidade da água do rio Iguaçu em dois diferentes pontos. As coletas no rio Iguaçu foram realizadas em um período de seca (Abril) e outro de chuvas (Outubro). O primeiro local amostrado foi Irineópolis (SC) e o segundo Porto Amazonas (PR), local este onde a concentração de emissões urbanas e industriais é maior. Utilizamos como ponto de referência o Parque Ecológico Costa, por ser um local isento de contaminação. Logo após a captura dos peixes, foram retiradas pequenas quantidades de sangue com microcapilar heparinizado para a realização do Teste do Micronúcleo Písceo (MNP), bem como para o Ensaio Cometa. O Ensaio Cometa foi realizado 48 horas após a coleta do sangue e o esfregaço para a análise do Micronúcleo Písceo foi realizado no momento da coleta. No ensaio cometa os danos ao DNA foram classificados, de acordo com o tamanho da cauda, em cinco classes: 0 – sem dano; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano grande; 4 – dano máximo. A análise estatística dos escores foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis com nível de significância $p < 0,05$. Para o teste do Micronúcleo Písceo foram computadas as células que apresentaram micronúcleos bem como aquelas com alterações morfológicas nucleares. Para a primeira coleta o MNP não mostrou diferença entre os pontos de coleta, porém revelou diferença significativa entre os locais monitorados e o local de referência. O Ensaio Cometa revelou que existe diferença entre Irineópolis e Porto Amazonas e entre Porto Amazonas e o local de referência, no entanto não mostrou diferença entre Irineópolis e o Parque Costa. Na segunda coleta, os resultados do MNP foram similares à coleta anterior. Entretanto, o ensaio cometa mostrou que o ponto em Irineópolis estava com suas águas apresentando um potencial genotóxico superior ao ponto referência. O ponto em Porto Amazonas apresentou uma genotoxicidade intermediária em relação à Irineópolis e o Parque Costa. Portanto, através do Ensaio Cometa podemos notar a existência de uma maior genotoxicidade nas águas de Porto Amazonas no período de seca, já com o aumento das chuvas e o carregamento de substâncias, a genotoxicidade das águas em Irineópolis aumentaram consideravelmente.

1 INTRODUÇÃO

A bacia do rio Iguaçu está localizada na porção da margem esquerda do curso médio do rio Paraná, integrando a porção setentrional da província Paraná-Platense, de acordo com a caracterização das áreas ictiológicas da América do Sul. Esta bacia estende-se por 72.000 km², sendo 57.330 km² pertencentes ao estado do Paraná, 13.470 km² ao estado de Santa Catarina, totalizando 70.800 km² em território brasileiro e 1.200 km² na Província de Misiones, em território Argentino (SEVERI; CORDEIRO, 1994). Ao longo de seus 910 km de extensão, desde as suas cabeceiras na porção Ocidental da Serra do Mar até sua foz no rio Paraná, o rio Iguaçu percorre o estado do Paraná até União da Vitória no sentido NE-SO para então servir de limite natural do estado de Santa Catarina e tomar rumo atravessando, deste modo, diferentes regiões naturais individualizadas pela geomorfologia, geologia, solos, clima e vegetação (MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA, 1990).

O processo geomorfológico de formação da bacia do Iguaçu remonta ao Terciário, estando associado a movimentos verticais escalonados responsáveis pelo soerguimento da Serra do Mar e a origem dos três planaltos Paranaenses sendo: o primeiro na região de Curitiba, o segundo na região de Ponta Grossa/Palmeira e o terceiro na região de Guarapuava/Palmas. O Iguaçu constitui-se assim num rio geologicamente antigo, porém rejuvenescido por levantamentos diversos, caracterizados por corredeiras e saltos, alternados por meandros de curvaturas amplas e várzeas extensas (DOMINGUES, 2005).

Devido ao surgimento das Cataratas do Iguaçu, ocorrido há aproximadamente 22 milhões de anos (período Oligo-Mioceno), as populações de peixes da bacia do rio Iguaçu foram isoladas das do rio Paraná por estas quedas, que apresentam cerca de 70m de desnível (HASEMAN, 1911, *apud* DOMINGUES, 2005). Tal fato favoreceu um processo de especiação, que seria responsável pelo considerável grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna (KANTEK; FENOCCHIO; CESTARI, 2003).

Os rios e riachos apresentam um fluxo de água unidirecional, com processos de erosão e deposição, apresentando diferentes tipos de substratos (BARRELLA, 2001, *apud* BIFI *et al.*, 2006) e proporcionando o arrasto de material

orgânico e inorgânico no sentido nascente-foz. Isso possibilita que componentes indesejados ao ambiente sejam carregados pelas chuvas, percorrendo o leito dos rios e riachos, causando efeitos sobre suas comunidades (BIFI *et al.*, 2006).

As principais causas da deterioração das bacias hidrográficas são: desmatamento, falta de conservação dos solos nas pastagens, lavouras e estradas, assoreamento, introdução de descargas de agrotóxicos, poluição por esgotos e lixos domésticos e hospitalares, esgotos industriais e da agricultura (por agrotóxicos e suas embalagens) e a expansão urbana, com o uso e ocupação do solo desordenado, sem planejamento ambiental adequado (BARROS; SILVA; SOSA, 2005).

Atualmente ambientes aquáticos como rios, estuários, lagoas e oceanos, próximos a grandes cidades, recebem seus esgotos e efluentes industriais. Estes têm sido agrupados de acordo com sua origem industrial. As maiores categorias incluem químicos e derivados, fabricação de papel e munições, refinaria de petróleo, indústrias de metais primários e outros (HOUK, 1992).

Com a implantação da agricultura industrial, extensas áreas naturais têm sido substituídas por monoculturas, causando um grave desequilíbrio no solo e o desenvolvimento de plantas e insetos indesejáveis. Assim, passaram a ser utilizados diversos agro-químicos, entre fertilizantes e agrotóxicos, o que tornou a agricultura uma das principais fontes de contaminantes aquáticos (KLEMZ, 2002).

A introdução de substâncias tóxicas no ambiente aquático além de causar efeitos locais e imediatos, pode levar à alterações sistêmicas, como a contaminação de bacias hidrográficas e o comprometimento de reservatórios subterrâneos através da infiltração pelo solo. Assim, a comunidade aquática, bem como as comunidades que fazem uso dos recursos hídricos podem ser expostas e sofrer efeitos de contaminação crônica (THOMPSON; LANGTON; HART, 1995).

Muitas substâncias tóxicas como metais pesados e compostos orgânicos podem ser transferidos dos tecidos dos organismos para os seus predadores e chegar a concentrações de maiores magnitudes em níveis tróficos superiores (DE LEMOS; TERRA, 2003).

Algumas das conseqüências destes tóxicos em organismos aquáticos incluem defeitos de hereditariedade devido a mutações e efeitos teratogênicos em

células germinativas, declínio populacional, efeitos carcinogênicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998), redução de crescimento, desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (LEE; STEINERT, 2003). Em humanos são citados, além da toxicidade que pode levar ao câncer, doenças como arteriosclerose, doenças cardiovasculares e velhice prematura (GROVER; KAUR, 1999).

Dentre as diferentes substâncias químicas produzidas atualmente pela humanidade, apenas uma pequena parcela destas tem sido estudada quanto aos seus efeitos nos seres vivos. Com tantas dessas substâncias chegando ao ambiente, é natural pensar que algumas delas possam estar se fixando nos indivíduos que compõem as cadeias alimentares (FERRARO, 2003). Diante deste cenário de destruição e poluição do potencial hídrico existente no país, o presente trabalho tem como principal intuito analisar a qualidade das águas do rio Iguazu utilizando biomarcadores genéticos.

Tradicionalmente, os poluentes lançados direta ou indiretamente nos corpos d'água são mais reconhecidos por suas características físico-químicas. A noção clássica de contaminação envolve a presença de substâncias potencialmente nocivas nas águas, e a determinação da presença e concentração destes elementos tem sido fundamentada quase que exclusivamente em avaliações físico-químicas baseadas no reconhecimento de poluentes específicos em pontos amostrais determinados. Desconsidera-se, assim, o seu efeito nas comunidades aquáticas bem como a capacidade que os organismos vivos têm de atuar ativamente na manutenção do equilíbrio geral do ecossistema impactado (IAP, 2005).

Diante disto, nas últimas décadas têm aumentado o interesse da comunidade científica e agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle aos agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA *et al.*, 2003). Este interesse foi intensificado em razão do constante crescimento populacional e o consequente aumento da industrialização, bem como a utilização inadequada de recursos naturais. Para tanto, águas e sedimentos podem ter sua genotoxicidade testada em condições laboratoriais usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas. Os interesses também têm sido focados em testes de laboratório usando

organismos aquáticos como, por exemplo, anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI *et al.*, 1996).

Avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais por si só não é suficiente, havendo a necessidade de se detectar e avaliar o impacto destes poluentes nos organismos expostos, devido ao fato de existirem diferenças na forma de metabolizar os xenobióticos. Para se poder detectar e avaliar os efeitos biológicos utiliza-se o estudo e o desenvolvimento de biomarcadores.

Várias definições foram dadas para o termo "biomarcador", que geralmente é usado em um sentido amplo para incluir praticamente qualquer medição que reflita uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial, que pode ser químico, físico ou biológico (WHO, 1993). Um biomarcador é definido como uma mudança de uma resposta biológica (variando de celular e molecular através de respostas fisiológicas para mudanças comportamentais), que pode estar relacionada à exposição aos seus efeitos tóxicos ou de substâncias químicas no ambiente (VAN DER OOST, 2003).

Uma questão que pode ser respondida por biomarcadores é se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos. Se a resposta for positiva, investigações adicionais podem ser justificadas para determinar a natureza e o grau de contaminação. Por esta razão, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação (VAN DER OOST, 2003).

Desse modo, o impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula tem sido investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCARTHY e SHUGART, 1990). Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição genotóxica. Esses biomarcadores incluem testes como avaliação de aberrações cromossômicas, adutos de DNA, quebras no DNA e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL *et al.*, 2001).

Neste caso, a proposta de biomonitoramento é bem aceita, uma vez que os peixes são alguns dos organismos mais indicados para o propósito, pois sofrem bioacumulação e são capazes de responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações (GOKSOYR *et al.*, 1991).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL

Existem três principais situações que indicam a necessidade de um biomonitoramento: (i) quando há razões para se acreditar que espécies nativas se encontram ameaçadas; (ii) quando existem implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos potencialmente afetados e (iii) quando há o interesse em se conhecer a qualidade ambiental de um determinado local (DA SILVA *et al.*, 2003).

O monitoramento da presença de xenobióticos em ambientes aquáticos pode, a partir de estudos com espécies residentes, beneficiar a qualidade do ambiente, juntamente com a saúde humana. A localização e a determinação da concentração dos poluentes podem assegurar a vida destas espécies e também um ambiente saudável, garantindo ao homem sua utilização para alimentação, abastecimento e lazer (NICARETA, 2004).

O monitoramento ambiental, principalmente no que diz respeito a organismos expostos a poluentes, utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), propicia promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA *et al.*, 2003).

Ao longo do tempo, vários trabalhos vêm sendo feitos com o intuito de avaliar a qualidade ambiental de diferentes localidades, utilizando diversos biomarcadores. HOSE *et al.*, (1987) verificaram elevada freqüência de micronúcleos em peixes de locais contaminados na Califórnia; também avaliando a freqüência de micronúcleos, podemos citar DE FLORA *et al.*, (1993) que trabalharam nos rios Lambro e Po, na Itália; PANDRANGI *et al.*, (1995) que realizaram o ensaio cometa para avaliar animais coletados em sete diferentes localidades na Região dos Grandes Lagos, no Canadá; MINISSI, CICCOTTI e RIZZONI (1996) nos rios Tiber e Mignone. Na China, também podemos citar o trabalho de ZENG, LI e LIN (1999), que, ao empregarem o teste do micronúcleo em *Tradescantia*, verificaram a adequação deste teste, inclusive, para determinação de diferentes níveis de poluição em águas de três rios. Na Escócia, BOMBAIL, GORDON e BATTY (2001) avaliaram

a freqüência de micronúcleos e as quebras no DNA pelo ensaio cometa em *Pholis gunnellus*; na França FLAMMARION *et al.* (2002), trabalhando com quantificação de atividade enzimática e quebras no DNA detectadas pelo ensaio cometa em *Leuciscus cephalus* em cinco localidades no rio Moselle; WINTER *et al.* (2004) coletando essa mesma espécie em rios da Inglaterra, avaliaram quebras e adutos no DNA e RUSSO *et al.* (2004) nos rios Sarno e Astroni, também trabalhando com o ensaio cometa.

No Brasil, poucos trabalhos estão sendo realizados, porém esse número vem aumentando nos últimos anos. Destacam-se, nesse sentido, os trabalhos de AMADO *et al.* (2006) que utilizaram biomarcadores genéticos e imunológicos para determinação da contaminação de áreas na Lagoa dos Patos (RS); ANDRADE, FREITAS e SILVA (2004) que, trabalhando com tainhas (*Mugil sp*) e bagres (*Netuma sp*), verificaram a toxicidade no lago Armazém (RS). LEMOS *et al.* (2005), analisando quebras no DNA de tilápias (*T. rendalli*) coletadas no Lago Igapó II, em Londrina (PR). VICARI (2006) realizou um biomonitoramento da Baía de Paranaguá antes e depois do vazamento de óleo causado pelo acidente com o navio Vicuña utilizando como bioindicador a espécie *Atherinella brasiliensis*. Outro artigo aceito para publicação que também realizou avaliação na Baía de Paranaguá antes e após a explosão do Vicuña, foi o realizado por KATSUMITI *et al* (2008) com a espécie *Cathorops spixii*. BENINCÁ, em 2006, realizou um biomonitoramento nas lagoas estuarinas do Camacho e Santa Marta – SC com o acará *Geophagus brasiliensis*.

2.2 PEIXES EM BIOMONITORAMENTOS

O amplo uso de peixes é explicado pela sua capacidade de responder a tóxicos como os grandes vertebrados, podendo assim, ser bioindicadores dos potenciais carcinogênicos e teratogênicos em humanos. Os peixes indicam o potencial de exposição de populações humanas a genotóxicos químicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Peixes podem agir como organismos sentinela para indicar o potencial para exposição de populações humanas a substâncias genotóxicas presentes na água para consumo. Alimentos são o modo mais comum para exposição de populações humanas a tóxicos químicos sendo que peixes e crustáceos são reconhecidamente

os maiores vetores na transferência de contaminantes aos humanos. Por exemplo, peixes marinhos e crustáceos, que constituem importante fonte de proteínas em muitos países, são muitas vezes contaminados com altas concentrações de metilmercúrio (WHO, 1990) e a indução de danos cromossômicos foi encontrada nos linfócitos de pessoas expostas a metilmercúrio devido ao consumo de peixes contaminados (SKERFVING *et al.*, 1974, *apud* RAMSDORF, 2005), apesar de que os mecanismos precisos envolvidos nesses processos são até o momento pouco compreendidos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O potencial de efeitos genotóxicos em organismos aquáticos expostos a poluição é ainda pouco conhecido, embora a contaminação com elevadas concentrações de PHA (polihidroxialcanoato) em sedimentos no fundo já ter sido associada com elevadas prevalências de tumores em peixes habitantes de fundo (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Deve-se destacar, entretanto, a existência de sensibilidade diferenciada entre diferentes espécies de peixes, o que pode impossibilitar comparações entre diferentes dados e futuras generalizações. Por exemplo, SANCHEZ-GALAN (1999) verificou a sensibilidade do *Salmo trutta* ao cádmio e mercúrio com a indução de aumento significativo de micronúcleos após injeção peritoneal, enquanto que a espécie *Phoxinus phoxinus* apresentou-se sensível somente ao cádmio.

Utilizando duas espécies do gênero *Astyanax*, RAMSDORF (2007), avaliou o potencial genotóxico de uma área que apresentava histórico de contaminação por agrotóxicos. Além disso, também realizou um bioensaio para verificar se havia diferença na resposta entre os indivíduos das duas espécies, expostas ao sulfato de cobre. Seus resultados mostraram que ambas as espécies, *Astyanax sp B* e *A. altiparanae* podem ser utilizadas em biomonitoramentos, sendo o *Astyanax sp B* mais sensível à contaminação.

2.3 TESTE DO MICRONÚCLEO PISCEO

Esse teste mede o dano cromossômico estrutural ou numérico e tem sido usado para avaliar genotoxicidade, sendo um indicador recomendado para estudos ambientais tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME *et al.*, 1998).

Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer alterações nucleares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL *et al.*, 2001).

Existem vários ensaios de mutagenicidade e o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (MINISSI *et al.*, 1996), pois a maioria dos peixes possui um número relativamente grande de pequenos cromossomos o que dificulta a sua visualização (HOOFTMAN; VINK, 1981). Quando eritrócitos de peixes são usados não há consumo excessivo de tempo e não há sofrimento dos animais. Por estas razões, o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixes tem se mostrado uma técnica promissora em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

As alterações morfológicas nucleares têm sido interpretadas como lesões nucleares análogas aos micronúcleos. Os resultados de AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ (2000) mostraram que essas anomalias são induzidas por compostos genotóxicos bem conhecidos, mesmo quando os micronúcleos não foram induzidos.

Em peixes, diversos tipos de lesões nucleares ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990) descreveram e fotografaram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes. Essas lesões foram basicamente classificadas em:

- *Blebbled*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas

evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.

- *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.

- *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.

- *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma, geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear.

Essas anormalidades têm sido utilizadas por alguns autores como um indicativo do dano ao DNA de espécies de peixes, porém, CARRASCO, TYLBURY e MYERS (1990) não observaram uma associação significativa entre variações na morfologia do núcleo (incluindo micronúcleos) e os níveis de poluição química em sedimentos ou em tecidos de peixes, indicando uma fragilidade do uso do teste do micronúcleo em peixes. Sua possível falta de sensibilidade é devido à baixa e também variável frequência de micronúcleos em peixes silvestres.

2.4 ENSAIO COMETA

Os danos mais importantes em nível molecular são, sem dúvida, os vários tipos de danos causados ao DNA, incluindo as quebras, que são facilmente visualizadas pelo ensaio cometa (JHA, 2008).

O ensaio cometa investiga danos no DNA (simples, dupla-fita) em nível celular individual, através da medição da migração em gel do material genético de células, depois de uma corrida eletroforética (SINGH *et al.*, 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA, deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL *et al.*, 2001).

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

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

Várias publicações recentes corroboram a eficácia do ensaio cometa em detectar danos ao DNA de peixes, por diferentes mutagênicos, mas as respostas podem ser variáveis, de acordo com as condições experimentais, a espécie alvo, o tipo de célula, a classe de mutagênico e o tempo de exposição a este (BELPAEME *et al.*, 1998).

O ensaio cometa pode é uma ferramenta interessante para monitoramentos na demonstração de genotoxicidade de exposições e para investigar os impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental (BELPAEME *et al.*, 1998).

Habitualmente, o ensaio cometa, é realizado com eritrócitos, pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento celular, porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de contaminantes podem ser muitas vezes tecido-específicos. Pesquisas realizadas com o mutagênico EMS (etilmetanosulfato) mostraram resultados significantes para diferentes tecidos com o ensaio cometa, mostrando que sangue, fígado, brânquias e rim são sensíveis a essa substância. Os diferentes tecidos mostraram um padrão de resposta similar nos experimentos realizados, porém foram realizadas as seguintes constatações: maior sensibilidade em células de brânquias, as respostas das células do fígado foram sempre as menores e não foi observada tendência clara em células do rim (BELPAEME *et al.*, 1998).

As vantagens do ensaio cometa incluem: (a) efeitos genotóxicos podem ser observados em nível celular; (b) muitos tipos de células eucarióticas podem ser utilizadas para a realização do ensaio; (c) é necessário um pequeno número de células; (d) é geralmente mais rápido e mais sensível que outros testes para avaliar quebras no DNA; (e) quebras ao DNA se formam logo após a exposição ao xenobionte, permitindo uma avaliação rápida sobre a biota (FRENZILLI, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade das águas do Rio Iguaçu em dois diferentes pontos (Irineópolis - SC e Porto Amazonas - PR), utilizando como bioindicador peixes do gênero *Astyanax*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar as freqüências de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares em hemácias periféricas de *Astyanax sp* entre os dois pontos de coleta e o local de referência;

- Comparar os danos no DNA através do ensaio cometa em células sanguíneas de *Astyanax sp* entre os dois pontos de coleta e o local de referência;

- Verificar se há variação no número de alterações ao DNA dos peixes em diferentes estações do ano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORGANISMO UTILIZADO

Os lambaris são altamente utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Além disso, são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores, como os piscívoros.

Estudos taxonômicos feitos por SAMPAIO (1988), mostram que existem pelo menos sete espécies do gênero *Astyanax* no rio Iguaçu, das quais apenas uma está nomeada (*Astyanax gymnogenys* = sp A) sendo as demais denominadas de *Astyanax* sp B, C, D, E e F. Segundo AGOSTINHO e GOMES (1997) existe mais uma espécie, denominada *Astyanax* sp G. Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil (MELO, 2001), formando um complexo do ponto de vista taxonômico (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004).

Algumas das espécies coletadas no presente trabalho foram o *Astyanax altiparanae* (Figura 01) e *Astyanax* sp B (Figura 02), com maior incidência para esta última espécie.

A espécie *Astyanax altiparanae* distribui-se pela bacia do alto rio Tibagi (SHIBATTA *et al.*, 2002) e bacia do alto rio Iguaçu (GRAÇA; PAVANELLI, 2002). Caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI; BRITSKI, 2000) sendo esta espécie conhecida popularmente por lambari relógio ou lambari-de-rabo-amarelo.

O *Astyanax* sp B distribui-se pela bacia do alto rio Tibagi (SHIBATTA *et al.*, 2002) e bacia do alto rio Iguaçu (GRAÇA; PAVANELLI, 2002), é conhecido também

como lambari-de-rabo-vermelho por apresentar as nadadeiras caudal, dorsal e anal em tom avermelhado.

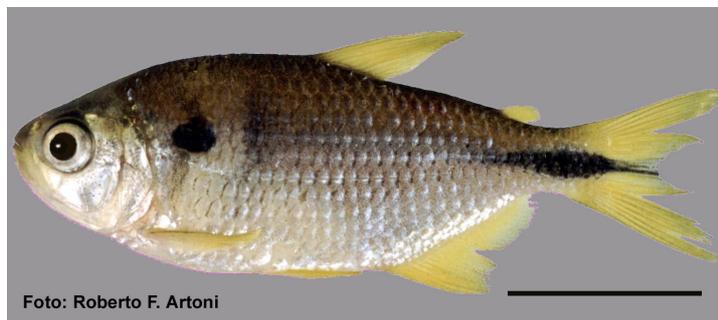


Figura 01- Exemplar de *Astyanax altiparanae*.
FONTE: RAMSDORF, 2007.



Figura 02 - Exemplar de *Astyanax sp B*.
FONTE: O autor.

4.2 LOCAIS DE COLETA

A coleta foi realizada em um período de 3 dias em Abril de 2008, em dois locais distintos ao longo do Rio Iguaçu (Figura 03). O primeiro ponto fica localizado na cidade de Irineópolis-SC e o segundo na cidade de Porto Amazonas-PR. Como referência, foram utilizados os resultados obtidos por RAMSDORF em 2007 no Parque Ecológico Costa.

4.2.1 IRINEÓPOLIS – SC

O município de Irineópolis está localizado no Planalto Norte catarinense, latitude 26°14'01" S e longitude 50° 47'59" W a uma altitude de 762 metros acima do nível do mar e a 219km de Curitiba. O clima predominante é o mesotérmico úmido, com verões amenos (Cfb de Köppen). A temperatura média anual gira em torno de 17 a 18°C e a precipitação média anual em torno de 1500 a 1700 mm, sendo que a

umidade relativa média gira em torno de 80 a 82% (PANDOLFO, 2002). O município possui uma área aproximada de 581,27km² e sua população estimada em 2004 era de 9.720 habitantes, tem sua economia baseada na agricultura, representando cerca de 85% desta. As poucas indústrias existentes são de cerâmica. A maior produção agrícola é de milho, mas cultiva-se também soja, feijão, fumo e trigo (SCHAFASCHEK, 2005).

Em Irineópolis, o rio Iguaçu apresenta água turva e sem odor. O ponto da coleta situa-se próximo a um local de captação de água para a cidade de Porto União e região, portanto, é de se esperar um local onde a qualidade da água seja relativamente melhor. Os efluentes domésticos e industriais já não são tão evidentes, no entanto a área é circundada por fazendas onde existem culturas que utilizam diversos tipos de agrotóxicos.

4.2.2 PORTO AMAZONAS - PR

O município de Porto Amazonas localiza-se próximo a região metropolitana de Curitiba, Latitude 25° 32' 41"S e Longitude 49° 53' 25" W, o clima, conforme classificação climática de Köepen, é do tipo Cfb – Clima temperado com temperatura média do mês mais frio abaixo de 18°C (mesotérmico), com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22° C e sem estação seca definida (FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ, 1984).

Porto Amazonas se formou em função do florescente comércio que era proporcionado pela navegabilidade do rio Iguaçu. A população é de aproximadamente 4648 habitantes, sendo 1.707 na área rural e 2.941 na área urbana. A taxa de crescimento anual da população foi de 3,57% no ano de 2006. A área total do município é de 190.613 km² e fica a 72 quilômetros da capital Curitiba. O setor primário da economia é constituído pelas atividades de agricultura, pecuária e extração de madeira. A agricultura apresenta como principais cultivos: milho, arroz, feijão, soja e fruticultura. A maçã é o principal produto da economia e absorve grande parte da mão-de-obra disponível. Porto Amazonas é hoje conhecida como a “Terra da maçã”, sendo um dos maiores produtores do Paraná. Na pecuária os bovinos e suínos formam os principais rebanhos. No setor secundário as atividades desenvolvidas são metalúrgicas, fábricas de papelão, plásticos e embalagens, além

de olarias e curtumes de pequeno porte. Já o setor terciário é composto por um comércio de bens essenciais: supermercados, confecções, farmácias, papelarias, materiais de construção (PROGRAMA LUZ PARA TODOS, 2007).

A cidade de Porto Amazonas é o ponto de coleta mais próximo ao pólo industrial de Araucária e a região metropolitana de Curitiba. Nesse ponto, o rio apresenta-se com uma coloração escura e um forte odor. Sendo assim, o rio Iguaçu pode estar recebendo grande quantidade de resíduos urbanos e industriais em seu curso antes de chegar ao segundo ponto de coleta. Ainda com a atividade agrícola da cidade, há provavelmente um grande influxo de agrotóxicos no rio através do escoamento superficial e da lixiviação.

4.2.3 PARQUE ECOLÓGICO COSTA

Situado na Rua Nicola Pelanda, s/N, no bairro Umbará em Curitiba (PR), criado em um local onde anteriormente ocorria extração de areia e atualmente existe um pesque-pague (Figura 04). Não há nenhum relato de contaminação no local, o que possibilita o uso das espécies encontradas como local de referência para o experimento.

O Parque Ecológico Costa é considerado pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) como parte integrante do Parque Metropolitano do Iguaçu. O Parque Metropolitano é um projeto do IAP para recuperação das áreas degradadas da várzea do Rio Iguaçu. Esse projeto tem uma extensão de 100 quilômetros e começa na nascente em São José dos Pinhais e engloba o Parque Náutico do Clube Atlético Paranaense, o Zoológico e o Parque Ecológico Costa (AREAL COSTA, 2006).

O Parque Ecológico Costa contava com uma equipe especializada para a conservação, preservação e readaptação da flora e fauna nativas em sua grande área destinada ao lazer, diversão e educação ambiental do público. Atualmente se encontra desativado.

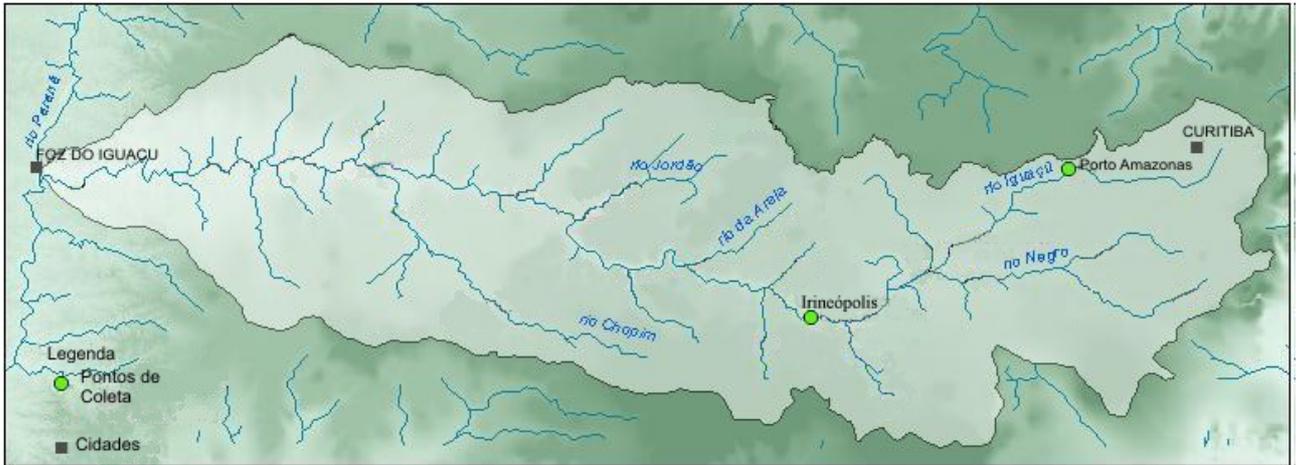


Figura 03 – Bacia do rio Iguazu destacando os pontos de coleta.
FONTE: www.copel.com.br, modificado pelo autor.



Figura 04- Vista aérea das lagoas do Parque Ecológico Costa.
FONTE: AREAL COSTA, 2006.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 COLETAS

Nas coletas foram utilizadas redes de espera, caniços e tarrafas para a captura dos animais. Logo após a captura os peixes foram anestesiados em benzocaína 10%, que segundo GONTIJO *et al.*, 2003, não causa efeitos genotóxicos em peixes, e só depois o animal era eutanasiado.

4.3.2 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações. A técnica aplicada consistiu das etapas:

- Lâminas bem limpas foram identificadas.
- O peixe foi anestesiado com benzocaína na concentração de 10%
- O sangue de cada animal foi retirado e uma gota foi pingada na superfície da lâmina.
- Com o auxílio de uma lamínula, fez-se um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina.
- As lâminas, após secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.
- Em laboratório, as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos.
- A análise das lâminas fez-se varrendo aleatoriamente as mesmas até a contagem de 2000 células de cada animal. Na análise, foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intactas, sendo consideradas como micronúcleos as partículas que em relação ao núcleo principal: não excederem 1/3 do seu tamanho, estivessem nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, mas que puderam ser descritas como alterações morfológicas

nucleares segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990) também foram analisadas.

4.3.3 ENSAIO COMETA

A técnica utilizada foi a descrita por SPEIT e HARTMANN (1999), com alterações conforme FERRARO *et al.*, 2004. Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir.

Preparação das lâminas com cobertura de agarose:

- Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em erlenmeyer, com agitação e aquecimento por duas horas.

- Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada ao forno de microondas e depois ao agitador com aquecimento até levantar fervura novamente. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.

- As lâminas, previamente limpas, foram então mergulhadas na agarose aquecida, sendo que, o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada, limpo com um lenço de papel.

- As lâminas foram deixadas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente para solidificar a cobertura de agarose.

Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP):

- Foram dissolvidos 100 mg de agarose normal em 20 mL de PBS.

- Essa solução foi então levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.

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

Preparação do Sangue:

- Após o peixe anestesiado, o sangue periférico foi retirado a partir da veia dorsal por punção vertical na base da nadadeira anal, com microcapilar heparinizado.

- Uma pequena amostra de sangue foi colocada em microtubos do tipo Eppendorf[®] contendo 1mL de soro bovino fetal, que segundo RAMSDORF, 2008, pode manter as células viáveis por um período de até 48 horas. Esse material foi estocado em caixas térmicas contendo gelo para transporte até o laboratório.

- No laboratório, foram coletados 10 µl da solução do microtubo e misturados com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

- Esta suspensão celular foi então depositada sobre uma lâmina já coberta com agarose normal.

- Após a deposição da mistura agarose LMP e suspensão celular sobre a lâmina, esta foi então coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos.

- Decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas.

- As lâminas foram então acondicionadas em cubetas contendo solução de lise por 24 horas, até a eletroforese.

- Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas permaneceram na solução de eletroforese por 25 minutos para a desespiralização do DNA.

- Após o tempo de lise, as lâminas foram então transferidas para a cuba de eletroforese.

- Em seguida, a corrida de eletroforese foi iniciada a 25V e 300 mA por 25 minutos. Ela foi realizada sob refrigeração (aproximadamente 4°C) e na ausência de luz, com uma solução de eletroforese com pH maior que 13.

- Após o tempo de corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) em 3 seções de 5 minutos cada.

- As lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.

- Para a coloração, foram adicionadas 20µl de brometo de etídeo em cada lâmina, que foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.

- As lâminas foram randomicamente varridas, analisando-se 100 núcleos em cada lâmina; estes foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. A classificação dos nucleóides (Figura 05) foi realizada conforme as classes: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano grande) e 4 (dano máximo). Foi realizada a quantificação dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

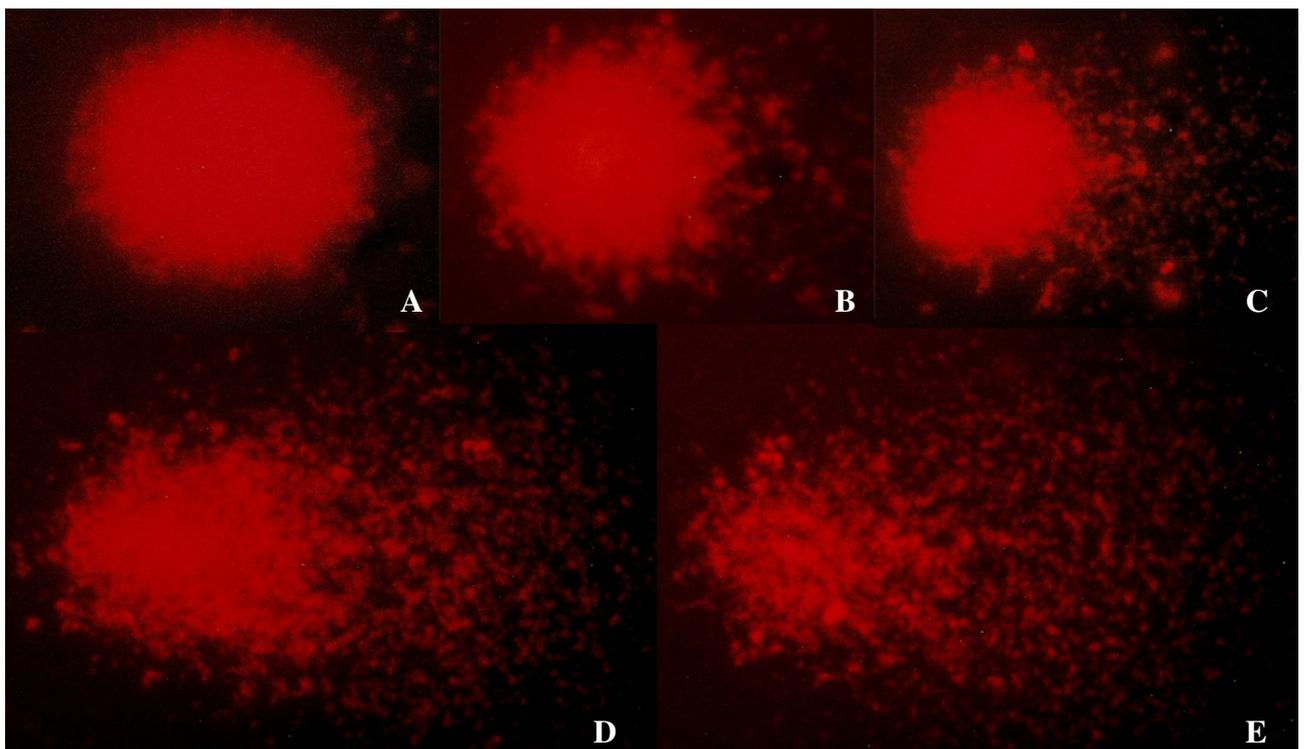


Figura 05 - Classificação dos danos do ensaio cometa. A) classe 0, sem dano; B) classe 1, dano pequeno; C) classe 2, dano médio; D) classe 3, dano grande; E) classe 4, dano máximo.]
FONTE: O autor.

4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando-se que a distribuição de freqüências dos erros amostrais não é normal, as variâncias não são homogêneas, a amostra não é aceitavelmente simétrica, e não possui um único ponto máximo centrado no intervalo de classe onde está a medida da distribuição, e conseqüentemente o histograma de freqüência não possui um contorno semelhante ao desenho em forma de sino da curva normal, portanto os dados obtidos foram analisados com testes não paramétricos, baseando-se assim os resultados na mediana e os desvios nos primeiro e terceiro quartís.

Os dados obtidos para o Teste de Micronúcleo Písceo e alterações morfológicas nucleares, bem como para Ensaio Cometa, por não se distribuírem de acordo com a curva normal, foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (usado para mais de duas amostras independentes). O nível de significância considerado nas análises foi $p < 0,05$.

Os dados foram analisados no programa BioEstat 2.0.

5 RESULTADOS

5.1 COLETA DE ABRIL DE 2008

Em Irineópolis foram coletados 16 exemplares de *Astyanax sp.* Análises físico-químicas mostraram pH de 7,1; temperatura em torno de 22,4°C e nível de oxigênio dissolvido de 51%.

Em Porto Amazonas, foram coletados 14 peixes do gênero *Astyanax*. Análises físico-químicas mostraram pH de 7,2; temperatura: 21,8°C e O₂: 50% ~ 55%. Neste ponto a água se apresentava muito turva e com um forte odor.

5.1.1 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

Foram analisadas 2000 células de cada indivíduo, observando-se a presença ou ausência das estruturas classicamente descritas como micronúcleos bem como as alterações morfológicas nucleares (Figura 06).

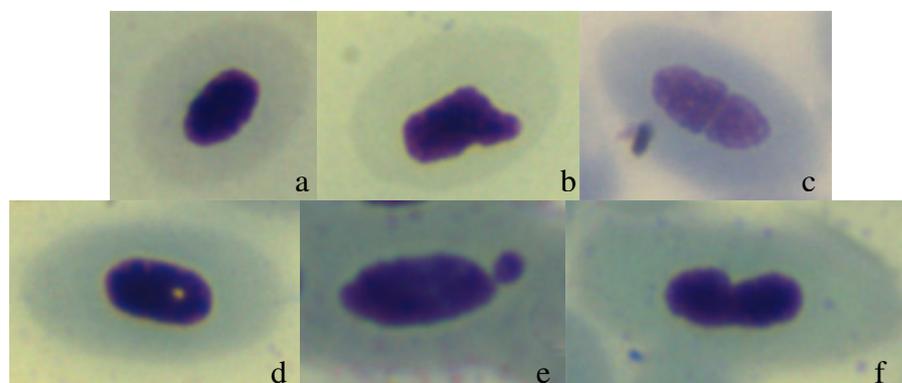


Figura 06 – a) núcleo normal; b-f) Alterações morfológicas nucleares.
FONTE: O autor.

Para fins de comparação, utilizamos como referência resultados obtidos a partir de *Astyanax sp B* coletados por RAMSDORF (2007), no Parque Ecológico Costa.

O teste de Kruskal-Wallis revelou que existe diferença significativa entre as medianas das alterações nucleares dos peixes dos dois locais do rio Iguaçu quando comparada com as encontradas nos exemplares do ponto referência ($p=0$). Não houve diferença significativa ($p=0,43$) entre os pontos de coleta no rio Iguaçu (Figura

07). A Tabela 01 mostra que os animais coletados no ponto referência tem menor número de alterações morfológicas nucleares.

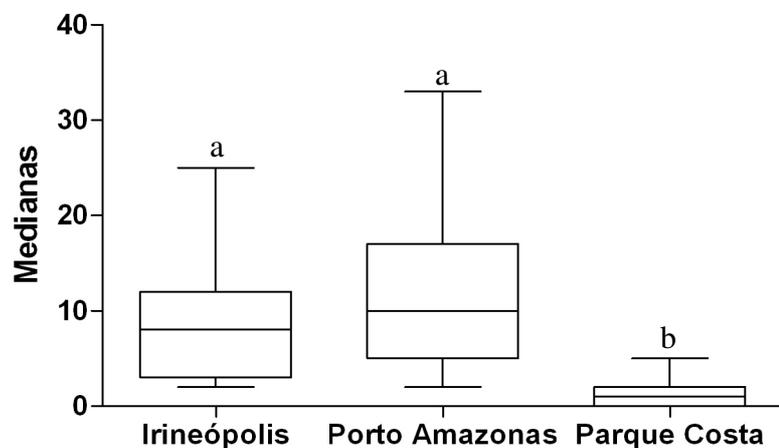


Figura 07 - Gráfico representando as medianas das alterações nucleares obtidas nos três locais amostrados.
 FONTE: O autor.

TABELA 01 – Número de alterações nucleares encontradas nos três locais de amostragem.

Local	Número de alterações de cada indivíduo por local									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irineópolis	11	15	12	10	25	6	10	3	5	18
	11	12	13	14	15	16				
	33	4	25	3	10	5				
Porto Amazonas	11	5	15	7	22	11	10	2	17	33
	11	12	13	14	15					
	4	25	3	10	5					
Parque Ecológico Costa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	0	1	5	2	2	1	0	1	0	

FONTE: O autor

5.1.2 ENSAIO COMETA

Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides que foram classificados segundo os danos no DNA (Figura 05) e a partir destes foram calculados os escores.

A análise estatística mostrou haver diferença significativa entre Irineópolis e Porto Amazonas ($p=0,0004$); e entre Porto Amazonas e o Parque Ecológico Costa (referência) ($p=0$); porém não mostrou diferença entre Irineópolis e o ponto referência ($p=0,36$) (Figura 08), indicando ser Porto Amazonas o local com mais danos ao DNA quando comparados aos outros dois locais. Os escores (Tabela 02) também indicam esse fato.

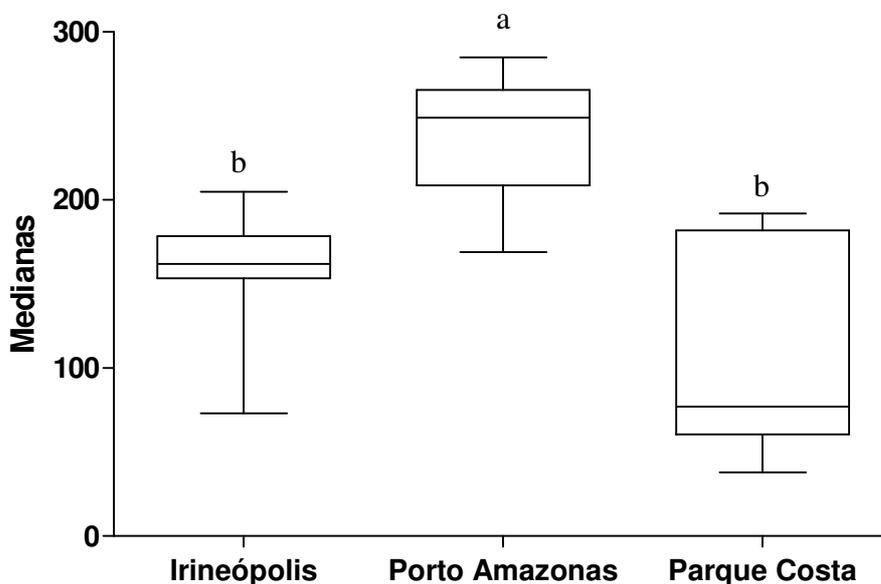


Figura 08 - Gráfico representando as medianas dos escores obtidos nos três locais amostrados. FONTE: O autor.

TABELA 02 – Escores de danos ao DNA das três localidades de amostragem.

Local	Número de alterações de cada indivíduo por local									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irineópolis	73	172	159	168	177	115	153	162	154	180
	11	12	13							
	189	161	205							
Porto Amazonas	182	217	255	242	263	236	273	263	282	184
	11	12	13	14						
	246	169	285	252						
Parque Ecológico Costa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	85	192	38	73	48	77	187	177	76	

FONTE: O autor

5.2 COLETA DE OUTUBRO DE 2008

Nesta segunda coleta, o rio havia subido seu nível cerca 5m (informação dos moradores), em relação à coleta de Abril, fato esse que fez com que a correnteza estivesse mais forte e a água não tinha odor algum em ambos os pontos.

Em Irineópolis, foram coletados 11 exemplares de *Astyanax sp.* As análises físico-químicas mostraram a temperatura da água em torno de 20°C, pH de 7,2 e oxigênio dissolvido variando entre 28 e 30 mg/L.

Em Porto Amazonas foram coletados 20 exemplares de *Astyanax sp.* Nesse local a temperatura da água era 21°C, pH era 6,3 e oxigênio dissolvido 40 mg/L. Vale salientar que não havia odor algum na água, fato muito diferente da primeira coleta, quando o odor da água era muito forte.

5.2.1 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES

A tabela 03 mostra a quantidade de alterações morfológicas encontradas nos animais coletados em ambas as localidades nessa coleta. Não foi encontrada diferença significativa entre os dois pontos de coleta ($p= 0,65$), porém encontramos diferença entre o ponto referência e ambos os pontos de coleta (Figura 09), assim como na primeira coleta. Tendo o Parque Costa apresentado menor quantidade de alterações morfológicas nucleares, conforme a Tabela 03.

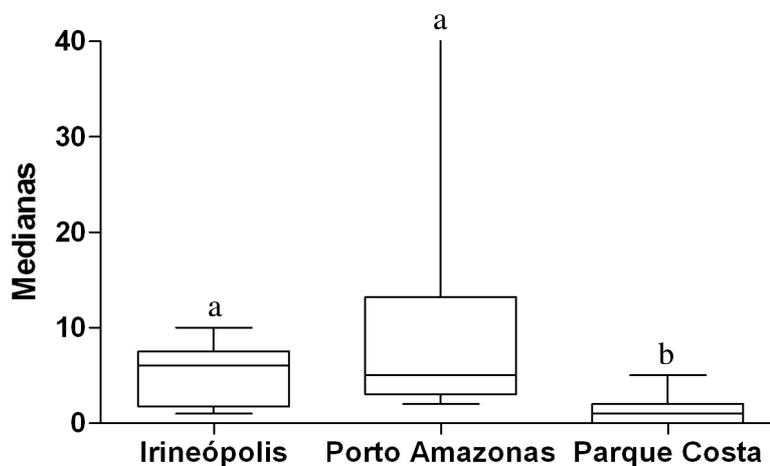


Figura 09 - Gráfico representando as medianas das alterações nucleares obtidas nos três locais amostrados.

FONTE: O autor

TABELA 03 – Número de alterações nucleares encontradas nos três locais de amostragem.

Local	Número de alterações de cada indivíduo por local									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irineópolis	7	9	10	1	7	6	1	2	6	6
	3	2	2	12	3	26	18	4	8	3
Porto Amazonas	11	12	13	14	15	16	17	18		
	6	7	2	17	6	4	4	59		
	0	1	5	2	2	1	0	1	0	
Parque Ecológico Costa										

FONTE: O autor

5.2.2 ENSAIO COMETA

Apesar de termos coletado 20 exemplares de *Astyanax sp* em Porto Amazonas, porém, somente 4 animais puderam ter suas lâminas do ensaio cometa analisadas devido a coagulação do sangue no momento da coleta (Tabela 04). As outras 16 lâminas não apresentaram nucleóides visíveis, ou então, um número insuficiente para análise.

O ensaio cometa revelou haver diferença significativa nos escores entre Irineópolis e o ponto referência. No entanto, não foi observada diferença entre Porto Amazonas e o ponto referência e entre Irineópolis e Porto Amazonas (Figura 10).

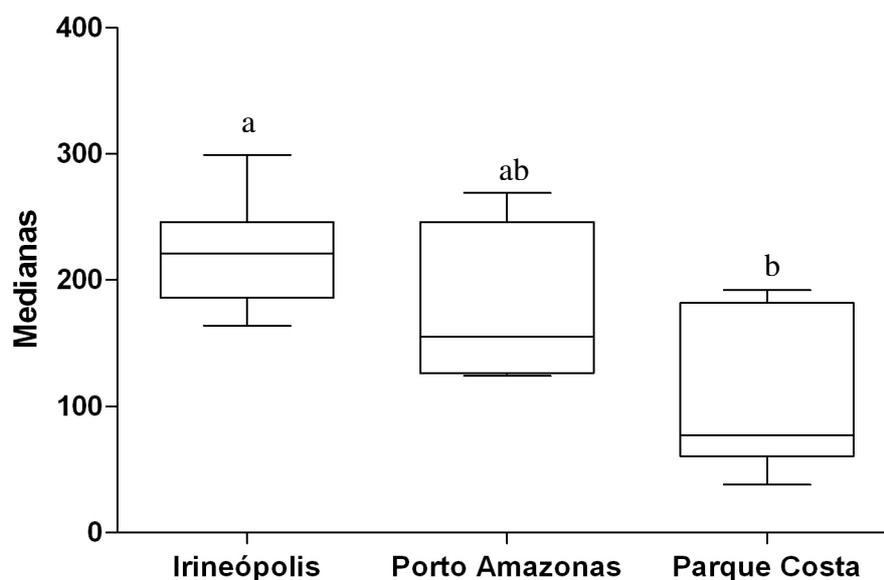


Figura 10 - Gráfico representando as medianas dos escores obtidos nos três locais amostrados.
FONTE: O autor

TABELA 04 – Escores de danos ao DNA das três localidades de

Local	Número de alterações de cada indivíduo por local									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irineópolis	240	221	165	299	213	186	229	210	164	260
	11									
	246									
Porto Amazonas	1	2	3	4						
	133	177	269	124						
Parque Ecológico Costa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	85	192	38	73	48	77	187	177	76	

FONTE: O autor

5.3 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS COLETAS

5.3.1 IRINEÓPOLIS

O teste do micronúcleo píceo não mostrou diferença significativa na genotoxicidade das águas do rio entre as coletas de Abril e Outubro de 2008 (Figura 11). Porém, o ensaio cometa mostrou que no mês de Outubro a genotoxicidade das águas estava mais elevada ($p= 0,0009$) que no mês de Abril (Figura 12).

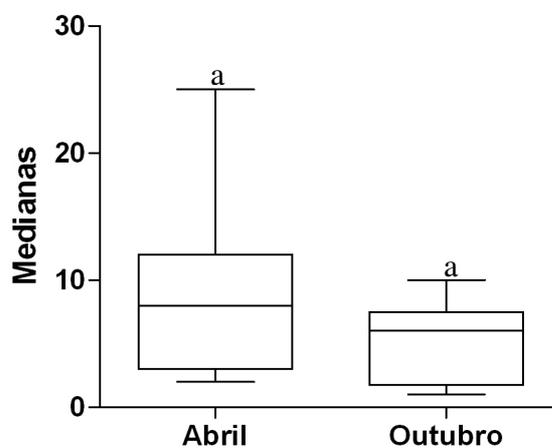


Figura 11 - Gráfico comparando as medianas das alterações nucleares nos animais coletados em Irineópolis nos meses de Abril e Outubro.
FONTE: O autor

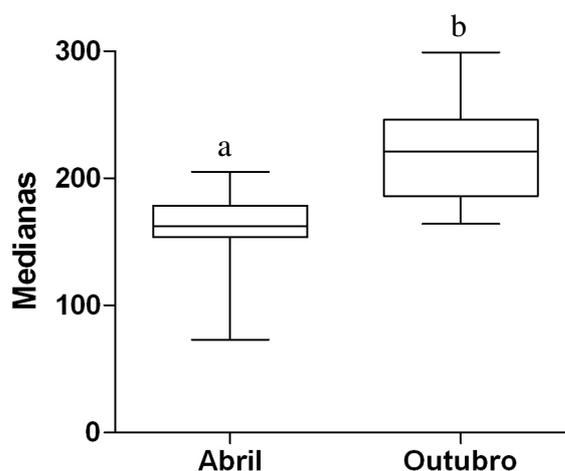


Figura 12 – Comparação entre as medianas dos escores dos animais coletados em Irineópolis nos meses de Abril e Outubro.
FONTE: O autor

5.3.2 PORTO AMAZONAS

Tanto o teste do micronúcleo píceo (Figura 13) quanto o ensaio cometa (Figura 14) não mostraram haver diferença significativa na genotoxicidade das águas do rio, nesse ponto, nos meses de Abril e Outubro.

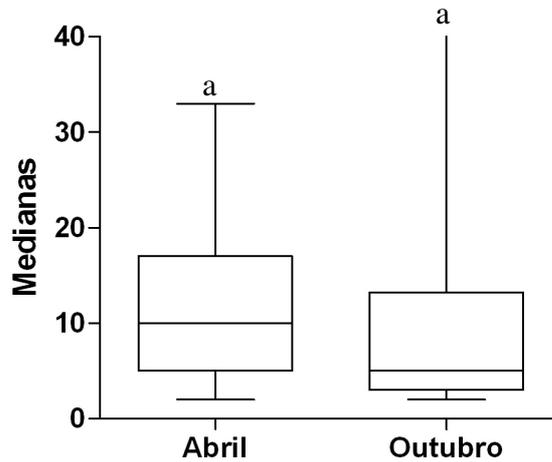


Figura 13 - Gráfico comparando as medianas das alterações nucleares nos animais coletados em Porto Amazonas nos meses de Abril e Outubro.
FONTE: O autor

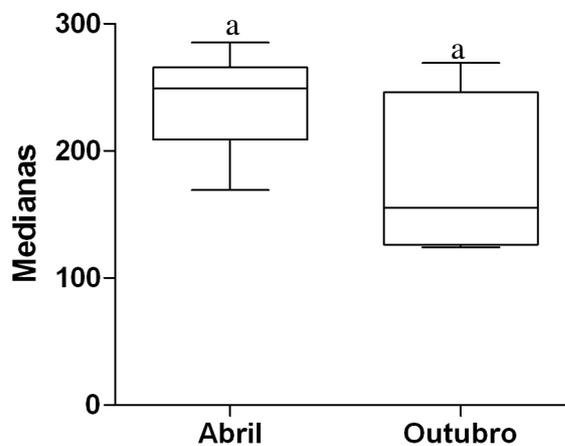


Figura 14 – Comparação entre as medianas dos escores dos animais coletados em Porto Amazonas nos meses de Abril e Outubro.
FONTE: O autor

6 DISCUSSÃO

Levando em conta a importância da bacia do Iguaçu tanto do ponto de vista ecológico como econômico, o presente trabalho traz informações importantes quanto à necessidade de recuperação da qualidade das águas e manutenção de populações de espécies endêmicas do rio Iguaçu.

O Instituto Ambiental do Paraná em 2005 realizou análises físico-químicas e toxicológicas da qualidade das águas do rio Iguaçu e alguns de seus afluentes na região metropolitana de Curitiba e em um ponto próximo a cidade de Porto Amazonas. Através das análises, foram destacados dois índices, a Avaliação Integrada da Qualidade das Águas (AIQA) e o Índice de Preservação das Comunidades Aquáticas (IPCA), que revelou que as águas do rio Iguaçu encontram-se poluídas de acordo com o AIQA, porém apresentam IPCA “bom” na região de Porto Amazonas, “regular” na região de Curitiba e “inadequado” na região de Araucária (IAP, 2005).

Os dados obtidos no presente trabalho com o teste do micronúcleo píceo revelaram que tanto o ponto Irineópolis (SC) quanto o ponto Porto Amazonas (PR) apresentaram um elevado grau de contaminação nas duas coletas, quando comparados com os resultados obtidos no ponto de referência.

Na coleta de Abril de 2008 o ensaio cometa revelou não haver significância entre os escores obtidos na cidade de Irineópolis quando comparados aos do Parque Ecológico Costa. Isso aconteceu provavelmente devido ao grande afastamento deste ponto em relação ao local mais crítico de despejos industriais e urbanos no rio Iguaçu, na região Metropolitana de Curitiba com efluentes de diversas origens. Quando comparados os pontos de Porto Amazonas e Parque Ecológico Costa, a diferença estatística dos escores foi significativa ($p=0$), provavelmente devido à proximidade de Porto Amazonas com a região Metropolitana de Curitiba, com elevado grau de industrialização e densidade urbana.

A diferença encontrada nos resultados do ensaio cometa na coleta de Abril pode ter sido em decorrência do tipo de contaminantes presentes no rio nos dois locais de coleta. Em Porto Amazonas a fauna pode estar sendo afetada por efluentes industriais e urbanos lançados na região de Curitiba e Araucária, em

Irineópolis a fauna pode estar afetada por agrotóxicos e efluentes domésticos de cidades menores ao longo do rio Iguaçu e seus afluentes. Este tipo de contaminação também influenciou no resultado do teste do micronúcleo písceo e de alterações morfológicas nucleares que mostrou ambas as localidades não adequadas.

Na coleta realizada em Outubro de 2008 o teste do micronúcleo písceo também não mostrou haver diferença entre as áreas de coleta, mas sim entre elas e o ponto referência, reforçando assim a hipótese de que as águas no rio Iguaçu tem um nível de genotoxicidade elevado.

Entretanto, no ensaio cometa, a situação se inverteu em relação à coleta anterior. Em Abril, o ponto de Porto Amazonas mostrava ter um nível de genotoxicidade mais elevado em relação aos pontos controle e Irineópolis. Na coleta de outubro Irineópolis mostrou um nível de genotoxicidade das águas superior ao ponto referência, diferente do observado em Porto Amazonas, semelhante ao Parque Ecológico Costa. Esses resultados podem estar ligados ao fato de a segunda coleta ter sido realizada durante a estação de chuvas. No período entre as coletas o nível do rio subiu cerca de 5 metros, fato este que pode ter carregado muitos poluentes rio abaixo pelo fato de rios e riachos apresentarem um fluxo de água unidirecional, que proporciona o arraste de material orgânico e inorgânico no sentido nascente-foz (BARRELLA, 2001, *apud* BIFI *et al.*, 2006), tornando o ponto mais afastado da região de maior contaminação também com elevado grau de contaminação.

Vale salientar que devido a um número de amostras muito baixo para o ensaio cometa em Porto Amazonas, os resultados não podem ser considerados totalmente confiáveis. A provável razão pela qual o ensaio cometa não deu certo para essas amostras pode estar no fato do sangue dos animais coagular muito rápido no momento da coleta, mesmo utilizando microcapilares heparinizados.

Os resultados obtidos a partir do teste do micronúcleo písceo nos mostram que os peixes de ambos os locais amostrados do rio apresentaram aumento no número de alterações nucleares quando comparado a um ponto sem histórico de contaminação. Tais resultados conflitam com os dados do monitoramento realizado pelo IAP em 2005 quanto ao Índice de Preservação das Comunidades Aquáticas (IPCA), que classificou as águas do rio Iguaçu em Porto Amazonas como de boa

qualidade, ou seja, águas com características necessárias para manter a sobrevivência e a reprodução dos organismos aquáticos. KURELEC (1993) *apud* NACCI (1996) menciona que danos ao DNA podem produzir um conjunto de efeitos genotóxicos para a saúde, como síndromes e redução da capacidade reprodutiva podendo levar a diminuição de número de espécies e frequência das mesmas nas comunidades aquáticas.

Para finalizar, acreditamos que os testes do micronúcleo písceo e do ensaio cometa devem ser incluídos nas metodologias utilizadas pelos órgãos ambientais Estaduais e Federais como IAP e IBAMA para a avaliação da qualidade das águas.

7 CONCLUSÕES

Organismos do gênero *Astyanax*, além de serem de fácil coleta e manuseio, se mostraram eficientes bioindicadores em biomonitoramentos ambientais quando se utilizam biomarcadores genéticos.

O teste do micronúcleo písceo sugere que o índice de dano no ponto referência é significativamente menor do que nos dois locais amostrados do rio Iguaçu em ambas as coletas. Porém o ensaio cometa sugere que as águas do rio Iguaçu em Irineópolis mostraram um potencial genotóxico menor que no ponto situado na cidade de Porto Amazonas durante a estação de seca, enquanto que no período de chuvas, as águas do rio em Irineópolis também apresentaram elevado potencial genotóxico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. (1997). **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM.

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

AMADO, L. L. *et al.* (2006). Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 199-206.

ANDRADE, V.M.; FREITAS, T.R.O.; SILVA, J. (2004). Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, v. 560, p.57-67.

AREAL COSTA (2008). Disponível em:
<http://www.arealcosta.com.br/meioambiente.html>. Acessado em 14 de junho.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. (2000). Introduction 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. 76, p. 177-186.

BARROS, M.; SILVA, M.; SOSA, R. (2008). **Geo-Goias**
<http://www3.agenciaambiental.go.gov.br/site/principal>. Acesso em: 20 de junho.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. (1998). Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research** v. 415(3), p.167-84.

BENINCÁ, C. (2006). **Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho-Jaguaruna (SC) e Sta Marta-Laguna (SC); utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BIFI, A. G.; BAUMGARTNER, D.; BAUMGARTNER, G.; FRANA, V. A.; DEBONA, T. (2006) Composição específica e abundância da ictiofauna do rio dos Padres, bacio do rio Iguçu, Brasil. **Acta. Sci. Biol. Sci.**, v. 28, n. 3, p. 203 – 211.

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

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

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. (2003). Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance.

DE FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F.D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. (1993). Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, v. 319, p. 167-177.

DE LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. (2003). Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica**. p.119-137.

DOMINGUES, M. S. (2005). **Citogenética comparative de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski. 2000 do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FERNANDES, C.A./ MARTINS-SANTOS, I.C. (2004). Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 1-5.

FERRARO, M.V.M. (2003). **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 103-107.

FLAMMARION, P.; DEVAUX, A.; NEHLS, S.; MIGEON, B.; NOURY, P.; GARRIC, J. (2002). Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 145-153.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. (2008). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**. in press. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001.

FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. (1984). **Cartas climáticas do Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR. p. 45.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. (2000) Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Sér Zool**, n. 13, p. 65-88.

GODOY, M.P. (1975). **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. Ed. Franciscana. São Paulo, v. 4, p. 847.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. (1991). Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone – inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, San Diego, v. 9, p. 1-13.

GONTIJO, A. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research** v. 534 p.165–172.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. (2002). *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçú River basin. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 451-453.

GROVER, I.S.; KAUR, S. (1999). Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research** v. 426 p.183-188.

HEDDLE, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-192.

HOSE, J.E.; CROSS, J.; SMITH, S.G.; DICHL, D. (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Mar. Environ. Res.**v. 22. p.167–176.

HOOFTMAN, R.; VINK, G. J. (1981). Cytogenetic effects on the eastern mudminnow *Umbra pigma* exposed to ethyl methanesulfonate benzo[a]pyrene and river water. **Ecotoxicology Environment Safety**. v. 5, p. 216-269.

HOUK, V.S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research** v. 277 p. 91-138.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (2005). **Monitoramento da qualidade das águas dos rios da região metropolitana de Curitiba, no período de 2002 a 2005**. Curitiba: IAP.

JHA, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. v. 23 n. 3 p. 207–221.

KANTEK, D. L. Z.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M. (2003). Cytogenetic Characterization and NOR Polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetraodonopterae, Characidae) from first plateau of Iguaçú River (Paraná State, Brazil). **Cytologia**, v. 68, n. 1, p. 19-24.

KATSUMITI, A.; VALDEZ-DOMINGOS, F. X.; AZEVEDO, M.; SILVA, M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA de ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; FREIRE, C. A. (2008). An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña oil spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**. DOI 10.1007/s10661-008-0309-3

KLEMZ, C. (2002). **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LEE, R.F.; STEINERT, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research** v. 544, p. 43-64.

LEMOS, N. G.; DIAS, A. L.; SILVA-SOUZA, A. T.; MANTOVANI, M. S. (2005). Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197-201.

McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (1990). **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis, Boca Raton, USA.

MELO, F. A. G. (2001). **Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos**. Arq. Nac. Rio de Janeiro, v. 59, p. 1-46.

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

MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA (MME), (1990). **Diagnóstico e Planejamento da Utilização dos Recursos Hídricos da Bacia do Iguaçu**. Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais, v.1, 33p.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research** v.399 p.135-147.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. (1996). Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquat. Toxicol**, v. 35, p. 197-210.

NICARETA, L. (2004). **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, Oak Brook, v. 122, p. 86- 94.

PANDOLFO, C.; BRAGA, H. J.; SILVA JR, V. P.; MASSIGNAM, A. M.; PEREIRA, E. S. (2002). **Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri.

PANDRANGI, R. ; PETRAS, M. ; RALPH, S. ; VRZOC, M. (1995). Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, p. 345-356.

PROGRAMA LUZ PARA TODOS. (2007). **O Programa Luz Para Todos no Paraná inaugurou obras de eletrificação e Telecentro Rural para a comunidade Nova Restinga**. Porto Amazonas (PR).

RAMSDORF, W. A. (2005). **Avaliação do efeito mutagênico do chumbo inorgânico (PbII) em traíra (*Hoplias malabaricus*) através do teste de micronúcleo písceo, frequência de aberrações cromossômicas e ensaio cometa em sangue e em tecido renal**. Monografia do curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RAMSDORF, W. A. (2007). **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *Astyanax altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. S. F.; FERRARO, M. V. V.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. (2009). Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**. v. 673, p. 78-81.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. (2004). Assessment of environments stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p.168-174.

SAMPAIO, F.A.A. (1988). **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da bacia do rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo desta fauna**. São Carlos (SP). Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A.R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. (1999). Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: Differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 43, p. 301-304.

SCHAFASCHEK, T. P. (2005). **Do convencional ao ecológico: normas, divergências e implicações sobre a produção apícola**. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

SCHMID, W. (1975). The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A.A.M. (1994). **Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçu**. Curitiba: IAP/GTZ, p. 128.

SHIBATTA, O. A.; ORSI, M. L.; BENNEMANN, S. T.; SILVA-SOUZA, A. T. (2002). Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E.

SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191.

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

THOMPSON, H.M.; LANGTON, S.D.; HART, A.D.M. (1995). Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife – a biochemical approach. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111C, p. 1-12.

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

VICARI, T. (2006). **Biomonitoramento da Baía de Paranaguá antes e depois do acidente com o navio Vicuña, utilizando como bioindicador a espécie *Atherinella brasiliensis* (Atheriniphorme, Atherinopsidae)**. Monografia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WHO, (1990). Environmental health criteria for methylmercury, **Environmental Health Criteria**, Geneva, v. 101, p. 144.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria, **World Health Organization**, Geneva, v. 155.

WINTER, M.; DAY, N.; HAYES, R.; TAYLOR, E.; BUTLER, P.; CHIPMAN, J. (2004). DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. **Mutation Research**, v. 552, p. 163-175.

ZENG, D.; LI, Y.; LIN, Q. (1999). Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China, **Mutation Research**, v. 426, p. 19-161.