

Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax spp.* para avaliação da contaminação aquática

The use of nuclear morphologic alterations in *Astyanax spp.* for evaluating water contamination

Cátia Cappelli Wachtel Dalla Cort*

Nédia de Castilhos Ghisi**

31

Artigo Original • Original Paper
O Mundo da Saúde - São Paulo - 2014;38(1):31-39

Resumo

No decorrer dos anos, os ecossistemas aquáticos têm sofrido grandes prejuízos, pois têm sido expostos a poluentes que causam impactos ambientais irreversíveis, tanto em áreas urbanas como rurais. Nesse sentido, o presente trabalho foi realizado em duas áreas urbanas da cidade de Guarapuava-PR e duas áreas rurais da cidade de Cândói-PR, em 2013, com objetivo de avaliar os impactos de diferentes fontes de poluição, quantificados por meio do teste de micronúcleo, usando como bioindicadores peixes do gênero *Astyanax*. Consistentes alterações na morfologia nuclear dos eritrócitos dos peixes foram visualizadas, com maior frequência na área mais urbanizada, a Lagoa das Lágrimas, e na área rural, o Alagado do Rio Jordão. Esse último local é um rio de grande porte, que recebe grandes despejos industriais de efluentes advindos de toda a cidade de Guarapuava e de uma fábrica de reciclagem de papel, localizada muito próxima ao local de coleta. O rio Candoizinho, um local rural protegido por uma ampla mata ciliar, apresentou a menor taxa de dano, mostrando-se como um local mais preservado. Um último ponto, localizado em um *campus* universitário semiurbanizado mostrou-se como uma taxa de alteração nuclear intermediária. Concluiu-se, então, que a poluição industrial e urbana pode causar danos à saúde dos indivíduos que habitam corpos hídricos.

Palavras-chave: Citotoxicidade Imunológica. Indústrias. Urbanização.

Abstract

Over the years, aquatic ecosystem have been suffering great losses because of being exposed to pollutants that cause irreversible environmental impacts, both in rural and urban areas. In this context, the present study was conducted in two urban areas of the city of Guarapuava (PR) and two rural areas of the city of Cândói (PR) during 2013, aiming to assess the impacts of different pollution sources. These impacts were quantified by micronucleus test, using fish individuals of the genus *Astyanax* as bioindicators. Consistent variations in nuclear morphology were identified in erythrocytes of fishes, more frequently in the most urbanized site, the Lagoa das Lágrimas, and in the rural area, the waterlogged in Jordão River. The latter site is a major river that receives effluents from the entire Guarapuava city and from a factory of recycling paper, located close to the sampled site. The Candoizinho River, a rural local protected by wide riparian vegetation, presented the lowest damage rate, being a preserved area. A last sampled site was located in a semi-urbanized area within a university campus. Organisms from this place showed intermediary damage rates. So, we concluded that industrial and urban pollution can cause irreversible damages to health of individuals inhabiting this water flow.

Keywords: Citotoxicity, Immunologic. Industry. Urbanization.

DOI: 10.15343/0104-7809.20143801031039

* Graduada do Curso de Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Guarapuava-PR, Brasil. E-mail: catia_cappelli@hotmail.com

** Professora da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Departamento de Biologia, Guarapuava-PR, Brasil. E-mail: nediaghisi@gmail.com

As autoras declaram não haver conflitos de interesse.

INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia, juntamente com o crescimento populacional, vem permitindo a geração de novos produtos industriais; os quais tem elevado o descarte de poluentes nos ecossistemas aquáticos¹. Segundo Arias, et al², nos últimos anos a biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas, que são lançadas diariamente em ambientes abertos e sem o devido tratamento, a partir de diversas fontes de emissão.

A contaminação pode acontecer de forma direta ou indireta. Diretamente, por escoamento de esgoto e por contaminantes industriais, ou indiretamente pelo acúmulo de substâncias no solo, que podem chegar até os recursos hídricos³. Por diversas vezes, os poluentes lançados nos ecossistemas aquáticos não são removidos por métodos naturais de purificação, deixando esses mananciais impotáveis, acarretando assim grandes problemas aos corpos d'água e afetando significativamente a saúde da população humana que faz uso desse corpo hídrico⁴.

Uma técnica muito eficaz e bastante utilizada para estudar os prejuízos causados pelos poluentes nos ambientes aquáticos é a avaliação por meio de organismos bioindicadores, que possibilita estudar os impactos da poluição sobre espécies ou conjuntos de espécies⁵. Essa técnica é realizada a partir da análise de características exteriores ou microscópicas, dos organismos em questão. Atualmente, o uso de bioindicadores vem sendo dividido em duas abordagens principais: a) aquela associada aos níveis superiores de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas b) em nível individual, que trata de alterações comportamentais, reprodutivas ou malformações, ou ainda em níveis biológicos inferiores como alterações em órgãos, tecidos, células ou moléculas⁶. Esses últimos incluem alterações bioquímicas e fisiológicas – abordando inclusive alterações na integridade da membrana celular e material genético.

O emprego dos bioindicadores admite a avaliação total dos efeitos ecológicos ocasionados por vários fatores; além dessa concepção, os bioindicadores são mais eficazes do que as medidas rápidas de parâmetros físicos e químicos que, periodicamente, são utilizados para avaliar a qualidade da água⁷.

Entre os diferentes bioindicadores, podem ser usados vários biomarcadores. Os biomarcadores são sinais precoces de alerta que refletem as respostas biológicas adversas a xenobióticos. Estes são medidos nos fluidos corporais, células ou tecidos, indicando alterações bioquímicas ou celulares devido à exposição a substâncias tóxicas⁶. Diante dos problemas ocasionados pela ação antrópica direta nos corpos hídricos, um biomarcador bastante utilizado e eficiente para medir impactos ambientais é o teste do micronúcleo písceo e contagem de alterações na morfologia nuclear em eritrócitos de peixes.

O teste do micronúcleo foi desenvolvido por Schmid⁸ com células da medula óssea de camundongos e adaptado por Hooftman e Raat⁹ para células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios, sendo então denominado de Teste do Micronúcleo Písceo – “Piscine Micronucleus Test”. Esse teste é capaz de avaliar e constatar a ação de agentes que quebram os cromossomos (genotóxicos e clastogênicos) ou a segregação dos mesmos de forma anormal¹⁰.

O micronúcleo se constitui em uma pequena porção de ácido desoxirribonucleico (DNA) delimitada por uma membrana a qual se encontra separada do núcleo principal. Segundo Rivero³, algum fragmento cromossômico se perde durante a anáfase na divisão celular, devido aos eventos clastogênicos e aneugênicos. Esses fragmentos são envolvidos por membrana nuclear durante a telófase na mitose, formando os micronúcleos.

No monitoramento ambiental, os peixes são bons bioindicadores para comparação entre áreas poluídas e não poluídas³. Recomenda-se a utilização desses organismos, pois peixes podem ser encontrados virtualmente em qualquer local no ambiente aquático e desempenham um papel ecológico importante nas cadeias alimentares, levando energia dos níveis inferiores aos superiores. Além disso, assim como mamíferos podem sofrer bioacumulação, estando aptos a responder a agentes mutagênicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450, um sistema de enzimas que desempenham um papel fundamental no metabolismo de substâncias exógenas e endógenas^{6,11}. Peixes do gênero *Astyanax*, popularmente conhecidos como

lambaris, tem potencial como bioindicador para a realização do teste de anormalidade nucleares, pois são espécimes bastante comuns, de pequeno porte, onívoros e com um valor econômico considerável¹² e sendo usados em vários estudos de biomonitoramento e bioensaio^{3,11,13,14,15}.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da poluição urbana e rural sobre o bioindicador *Astyanax*, usando como biomarcador o teste do micronúcleo písceo associado ao teste de alterações morfológicas nucleares. A hipótese é a de que em áreas de maior aglomeração humana são encontradas maiores taxas de alterações nucleares, pois nesta região os efluentes são liberados de forma mais concentrada.

MÉTODO

Peixes do gênero *Astyanax* (Figura 1) foram os bioindicadores escolhidos para realização da

presente pesquisa principalmente pelo fato de serem bastante comuns na região, facilitando a obtenção de um número amostral estatisticamente adequado. Além disso, oferecem vantagens de fácil manuseio, devido ao seu pequeno porte¹². Esses peixes são frequentemente utilizados para a alimentação humana, sendo um dos grupos de maior frequência encontrado nos rios de água doce¹¹ e se destacam por apresentar papel importante no equilíbrio dos ecossistemas¹³, estando entre os mais importantes componentes das cadeias alimentares em rios da América do Sul. Contudo, os estoques dessas espécies nos ecossistemas estão seriamente ameaçados pela introdução de predadores de grande porte nos rios da região¹⁶ e pela contaminação resultante de atividades humanas. Esses peixes apresentam grandes vantagens como bioindicadores, sendo utilizados em muitas pesquisas recentes com esse objetivo^{14,15,17}.

Figura 1. Exemplar de *Astyanax spp.* coletado no Campus CEDETEG. Guarapuava-PR. Barra: 2 cm



A coleta de indivíduos de *Astyanax spp.* foi realizada em duas áreas urbanas da cidade de Guarapuava-PR e duas áreas rurais da cidade de Cândói-PR (Figura 2), onde foram coletados no mínimo 20 indivíduos por área. Todos os pontos são localizados em rios afluentes do rio Jordão, bacia do Rio Iguaçu.

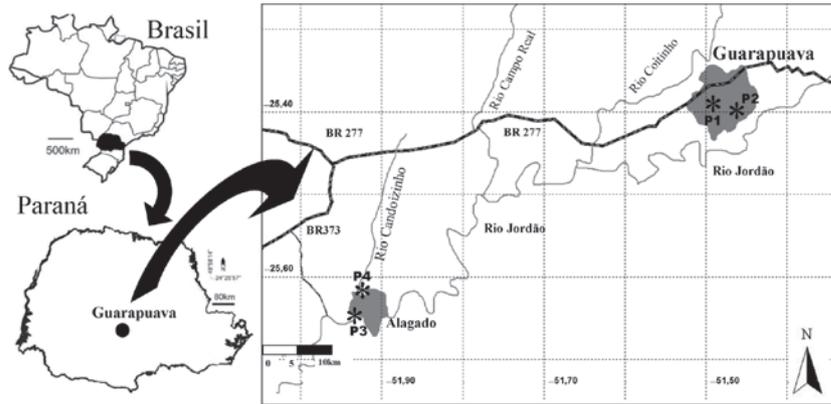
Um dos pontos urbanos localiza-se numa região universitária semiurbanizada, o *campus* Universitário da Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná (CEDETEG – Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Educacional de Guarapuava). O segundo ponto urbano é a Lagoa das Lágrimas, situada

no mesmo município, sendo uma área turística no centro da cidade, abrangendo uma praça de lazer, a qual recebe intensas visitas da população local, que utilizam o entorno do Lago para realizar caminhadas, entre outras atividades. Na cidade de Cândói, que se encontra a 92 km de Guarapuava temos os dois pontos amostrais na zona rural. Esse município tem uma grande parcela da população concentrada nas áreas rurais. Os dois pontos de coleta nessa região encontram-se na mesma comunidade, denominada Assentamento Água de Santa Clara, situado a 23 km do perímetro urbano.

Os animais foram capturados com o auxílio de armadilhas de espera (covos) e linha de pesca, sendo posteriormente levados para o laboratório e enumerados de acordo com o ponto amostral. As

coletas foram regulamentadas e licenciadas pelo órgão federal competente (Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade-ICMBio: autorização n. 39448-1).

Figura 2. Área de estudo com a localização dos pontos amostrais. P1: *campus* da Universidade Estadual do Centro-Oeste (CEDETEG) e P2: Lagoa das Lágrimas, ambos localizados no município de Guarapuava-PR, P3: Rio Jordão e P4: Rio Candoizinho, ambos localizados na Cidade de Cândói-PR

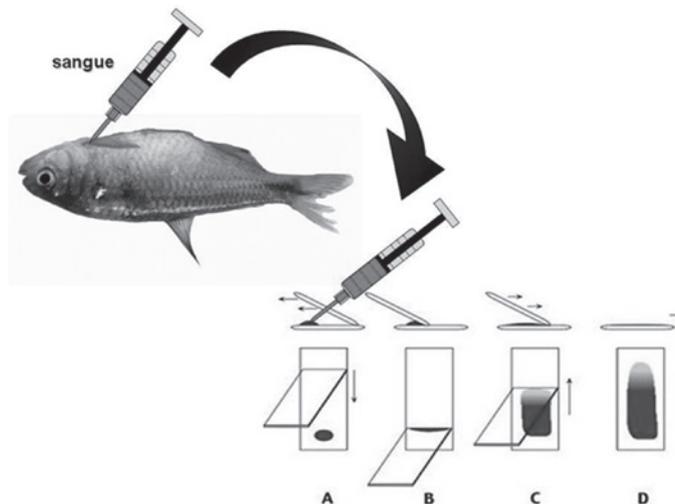


Em seguida, os exemplares foram anestesiados com cloridrato de benzocaína 20%, para evitar o sofrimento durante a coleta de sangue. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA/Unicentro – Ofício n. 101/2013, parecer n. 663/2013). Os eritrócitos foram retirados com auxílio de seringas de insulina previamente heparinizadas para evitar a coagulação do sangue. Após a retirada, o sangue foi destinado ao teste de micronúcleo, que consiste basicamente na realização de um esfregaço sanguíneo em uma lâmina, que foi posteriormente corada com Giemsa 10%. Então foi realizada a contagem de 1000 células do sangue por lâmina, com o intuito de quantificar aberrações

morfológicas nucleares nos eritrócitos dos indivíduos (Figura 3).

Para tomada de decisão entre uma análise de variância paramétrica ou não paramétrica, os dados obtidos foram testados quanto aos pressupostos estatísticos de normalidade e homogeneidade das variâncias Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Sendo que os dados se enquadraram como não-paramétricos, por isso aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e a diferença entre dois grupos foi evidenciada pelo teste de Mann-Whitney (Tabela 1). O teste consiste em comparar todos os pontos amostrais em relação a suas medianas totais de anormalidade nucleares registradas. O nível de significância considerado foi 0,05.

Figura 3. Esquema para confecção de lâminas do teste do micronúcleo píceo e aberrações morfológicas nucleares. Realizou-se uma punção cardíaca, pingou-se uma gota de sangue em uma lâmina (A), com o auxílio de uma lamínula fez-se o esfregaço (B, C e D)

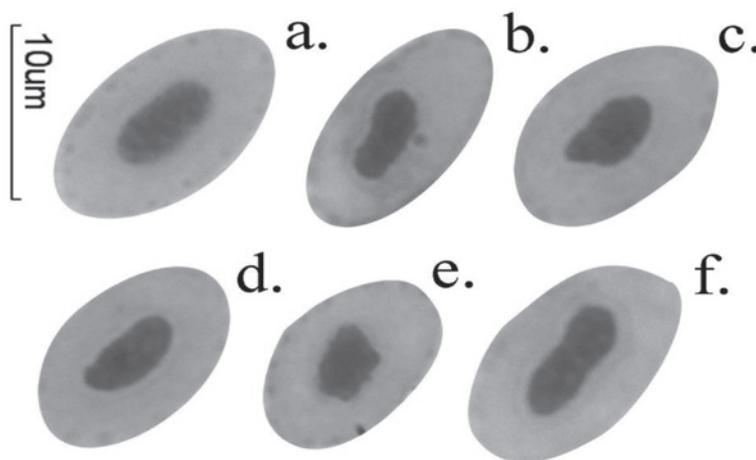


RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações morfológicas nucleares foram evidentes nos eritrócitos dos *Astyanax spp.* coletados em diferentes pontos amostrais e são esquematizados na Figura 4. Os resultados foram obtidos a partir da contagem de 1000 eritrócitos por

lâmina. Esse parâmetro foi utilizado para realizar uma quantificação dos efeitos mutagênicos e citotóxicos a que os diferentes tipos de poluição submetem esses corpos hídricos pesquisados, e assim avaliar a toxicidade de contaminação entre os corpos hídricos de áreas rurais e de áreas urbanas.

Figura 4. Fotos de microscopia de alterações morfológicas nucleares encontradas nas amostras, a: núcleo normal, b; d; e: Lobed, c: Blebbed, f: Vacuolated



As amostras do Rio Candoizinho, quando comparadas com a Lagoa das Lágrimas e Alagado do Rio Jordão, apresentaram diferença significativa, ou seja, o Rio Candoizinho apresentou, significativamente, menor taxa de da-

nos que os outros dois pontos citados acima, como pode ser observado na Figura 5. Os outros três pontos não diferiram entre si, e destes, o ponto do CEDETEG apresentou a menor mediana (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado do Teste de Mann-Whitney nas comparações entre os diferentes pontos amostrais, mostrando os níveis de significância (p)

	Mediana	CEDETEG	L. Lágrimas	Alagado
CEDETEG	0,5			
L. Lágrimas	1,0	0,34 n.s.		
Alagado	1,0	0,29 n.s.	0,56 n.s.	
r. Candoizinho	0,0	0,17 n.s.	0,008*	0,008*

Resultados significativos * ($p < 0,05$); n.s. = diferença não significativa.

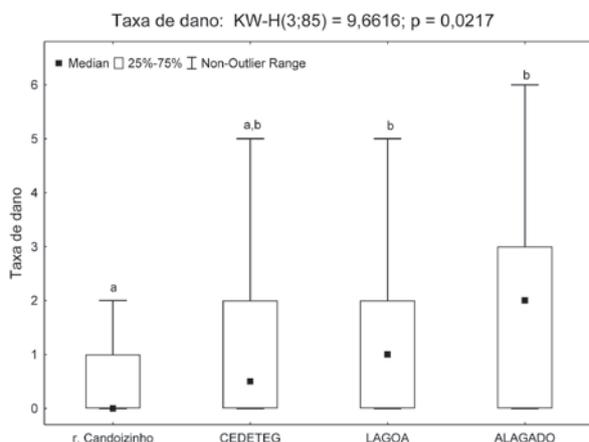
O Rio Candoizinho mostrou menor nível de alterações nucleares nos eritrócitos dos peixes analisados, pois é um rio que mantém uma mata ciliar dentro da prevista no novo código florestal (Lei n. 12.651, de 25 de maio 2012), para um rio dessa dimensão: aproximadamente 30 metros

de largura em seu curso total, a qual funciona como isolante contra poluentes terrestres¹⁸. Esse corpo hídrico está localizado na região rural de um assentamento e encontra-se conservado e protegido das modificações antrópicas¹⁹. Dessa maneira, essa mata ciliar funciona como barreira

natural impedindo a erosão e lixiviação de fertilizantes, pesticidas e dos mais diversos poluentes, que podem submeter a fauna aquática ao estresse e dano nuclear²⁰.

Nos indivíduos coletados no lago artificial do CEDETEG, observou-se o segundo menor índice de alterações morfológicas, sendo estatisticamente igual à mediana encontrada no Rio Candozinho. Esse lago está situado dentro na Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, mais precisamente no *campus* CEDETEG, sendo uma área semiurbanizada. Esse corpo hídrico foi construído a partir de um barramento artificial, e é caracterizado como um lago artificial²¹. Pelas amostras do local analisado pode-se observar que o ambiente é preservado e submetido a pouca ação antrópica, correspondendo a um ambiente relativamente equilibrado como já foi demonstrado por Vogel, et al²¹. Sobre o mesmo, não há muitas pesquisas realizadas que possam corroborar com os resultados obtidos nesse ambiente, o que torna esta pesquisa inédita, mas sabe-se que nesse ponto existe uma grande diversidade, e possivelmente esse ambiente aquático se mantém com pouca exposição a agentes tóxicos que causam danos à saúde dos organismos.

Figura 5. Box plot com os dados de micronúcleo píceo e alterações morfológicas nucleares de *Astyanax spp.* dos diferentes pontos amostrais. KW-H: resultado do teste de Kruskal-Wallis



Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa.

A mediana de danos nucleares da Lagoa das Lágrimas não foi a maior encontrada, mas esse grupo apresentou-se estatisticamente igual ao

grupo do alagado. Portanto, podemos considerar que esse local mostrou alterações relativamente altas, comparado com o dano intermediário observado no CEDETEG e o dano menor encontrado no rio Candozinho. Dos locais analisados, a Lagoa das Lágrimas é a área com maior nível de urbanização, localizada no centro da cidade de Guarapuava-PR. Atualmente, a ocupação urbana tem causado notórias mudanças ambientais nos sistemas fluviais²² devido a vários fatores externos como contaminação orgânica e química, falta de coleta seletiva dos lixos urbanos, saneamento básico, entre outros fatores que são reportados no município de Guarapuava^{23,24}.

O planeta Terra está cada vez mais superpovoado e urbanizado, e em associação ao desenvolvimento econômico e estilo de vida consumista aumentam ainda mais a pressão e o impacto sobre os ambientes aquáticos²⁵. Essa pressão é exercida, principalmente, sobre os mananciais hídricos que cruzam os centros urbanos, pois se tornaram os principais receptores de efluentes de estações de tratamento de esgoto humano e despejos residenciais e industriais²⁶. A alta taxa de alterações nucleares encontradas nos eritrócitos dos peixes da Lagoa das Lágrimas, comparativamente aos demais locais analisados possivelmente está relacionada à urbanização, pois é um centro de convivência habitual para a população, associada à falta de vegetação nativa ao redor do lago, deixando-o vulnerável aos impactos ambientais.

O ponto de coleta no Alagado do Rio Jordão está subsequente ao do Rio Candozinho, mas há uma barreira física que os separa: três cachoeiras em direção ao Alagado, que impedem o retorno dos indivíduos que estão no Alagado para o Rio Candozinho. O Alagado apesar de encontrar-se em uma área rural, apresentou-se com maior incidência de contaminação. Há dois fatores principais que podem ser causadores desse índice: 1º) A água do Rio Jordão é utilizada para fornecimento da população, industrial, na irrigação, além da diluição de esgoto doméstico e efluentes industriais e ainda geração de energia elétrica²⁷. O Rio Jordão flui lateralmente pela cidade de Guarapuava, uma cidade de porte médio que possui 167.328 habitantes, segundo censo do IBGE 2010, com estimativa para 2013 de 175.779

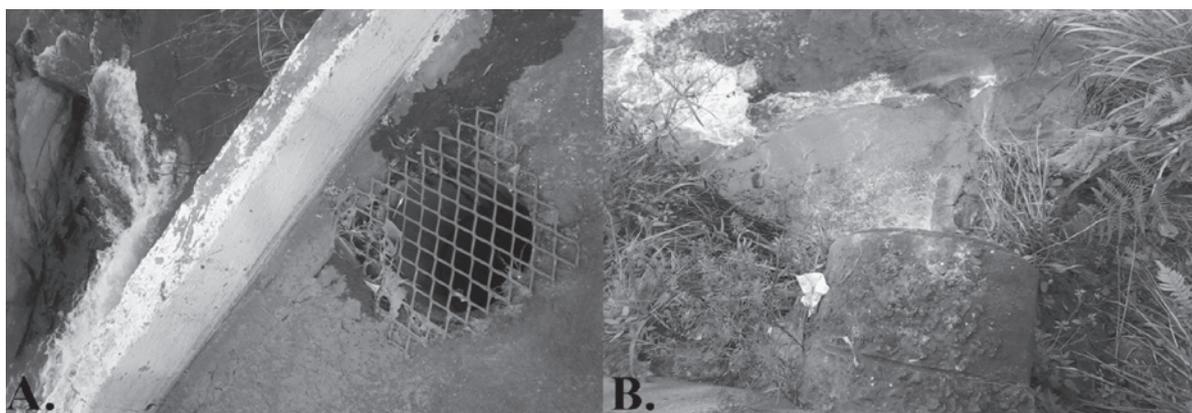
habitantes²⁸. É uma cidade que se destaca pela indústria madeireira e de celulose e pelas empresas do ramo alimentício e agroindustrial. Esse fato que faz com que a água seja tanto local de abastecimento como local de deposição dos resíduos gerados pelo uso da água nessas empresas²⁹. Em estudo prévio realizado pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), o Rio Jordão foi classificado como rio de classe 2. No entanto, as cargas de fosfato extrapolaram os níveis permitidos para essa classe, não se encontrando na conformidade estabelecida pela resolução CONAMA n. 20/1986. Os altos índices de coliformes fecais encontrados na água mostram o deficiente tratamento de esgoto doméstico, além da já referida contaminação por fosfato, que é associada à poluição difusa, proveniente de áreas de agricultura e pecuária e, análises indicam a presença de material recalcitrante, esses oriundos principalmente de efluentes industriais²⁷. 2º) Existência de uma fábrica de reciclagem de papel, que despeja seus efluentes diretamente acima do ponto de coleta, a qual acredita-se ter uma grande parcela da responsabilidade nos resultados obtidos, pois está localizada há muitos anos nesse ambiente e realiza despejo de poluentes de grande toxicidade utilizados na reciclagem de aparas. Segundo pesquisas realizadas pelo IAP, esse tipo de indústria de papel e celulose ocupa cerca de 75% da atividade econômica dentro da bacia do rio Jordão²⁷. Para a realização dos procedimentos de reciclagem, a principal combinação é água com papel, sendo que essa mistura é chamada de massa. A água é a mistura imprescindível para a formação

da massa, onde são realizadas várias lavagens para a purificação da celulose³⁰.

A filtragem da água para a purificação da celulose exige tratamento da mesma, a qual é reutilizada pela fábrica e lançada no rio. Em média, em um período de 1 hora de reciclagem, a água que passa pela tubulação da indústria é 75% reaproveitada no sistema da industrialização, e os outros 25% são lançados em um canal que desemboca no Rio Jordão. Quando do despejo desses 25% da água que voltam para o rio, pode-se observar uma mancha marrom ao cair nesse braço do Alagado, demonstrando que esse tratamento não é corretamente realizado. A presença de materiais flutuantes não naturais foi evidente nesse ponto, em desacordo com a legislação brasileira, estabelecida na Resolução CONAMA n. 357/2005³¹.

Ao lado da fábrica existe um tanque (flotador) que tem função de tornar potável a água que é utilizada para a formação da massa (retirando todas as impurezas). Para esse tratamento são utilizados polímeros, sendo estes potencialmente de alta toxicidade e que podem ocasionar impactos ambientais, gerando desequilíbrios e podendo alterar a qualidade da água nos corpos hídricos receptores³². Foi notável no entorno da fábrica, próximo à tubulação que está ligada ao tanque purificador, que no piso encontram-se muito resíduos, formando uma camada de cimentação conforme mostra a Figura 6, causada pela deposição da massa de papel. Com períodos de chuva essa massa é lavada, e escoada diretamente para os ambientes fluviais.

Figura 6. Fotos tiradas próximas à Fábrica de Reciclagem de Papel Santa Clara, situada junto ao Alagado do Rio Jordão. (A) Meio fio que fica aproximadamente oito metros da fábrica podendo observar a deposição de massa de papel, onde se encontra uma boca de lobo que direciona os fluidos da chuva junto com a massa que se depositou de forma acidental sobre o piso. Logo abaixo (B) cano de esgoto que direciona essa água para o Alagado do Rio Jordão



Um terceiro fator que pode afetar as características desse alagado deve-se ao fato que a área foi alagada para a construção de uma usina hidrelétrica, e nessa área alagada existiam plantações agrícolas que utilizavam agrotóxicos. Os agrotóxicos são usados nos processos agrícolas, com o objetivo de combater às pragas agrícolas, mas eventualmente atingem também outras formas de vidas não alvo causando grandes prejuízos¹³. Sabendo que a base da economia na bacia do Rio Jordão é a agricultura, é necessário ressaltar que seu trecho médio possui grande declividade, o qual favorece a erosão, o carreamento de nutrientes e agroquímicos para dentro dos corpos hídricos. Na região, segundo o IAP, a agricultura é responsável por mais de 80% do fósforo existente no Rio Jordão²⁷.

Os corpos hídricos são o último receptor de todo tipo de poluição e o desenvolvimento industrial e agrícola vem colaborando progressivamente no aumento dos poluentes que causam impactos muitas vezes irreversíveis sobre os ambientes aquáticos. Dessa maneira, uma avaliação da qualidade desses ambientes que muitas vezes

são utilizados pelas populações humanas a jusante é extremamente necessária. Considerando que a saúde dos peixes reflete a condição em que esses ecossistemas se encontram^{11,33,34}, esse tipo de avaliação se torna uma importante ferramenta para monitoramento ambiental.

CONCLUSÃO

Com a realização da pesquisa com bioindicadores do gênero *Astyanax* em diferentes áreas urbanas e rurais, observou-se que o local com maior concentração urbana e o maior receptor de efluentes urbano e industrial mostraram as maiores taxas de alterações morfológicas nucleares. O local semiurbanizado num *campus* universitário mostrou-se com uma taxa média de alteração e o local mais rural protegido por uma mata ciliar considerável mostrou-se com a menor taxa de dano nuclear. Diante disso, conclui-se que as concentrações humanas, associadas à industrialização e ao tratamento incorreto dos efluentes podem afetar a saúde dos peixes que residem nos corpos hídricos receptores.

REFERÊNCIAS

1. Jesus TB, Carvalho CEV. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecol Bras.* 2008;12(4):680-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2008.1204.07>
2. Arias ARL, Buss DF, Alburquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciêns Saúde Colet.* 2007;12(1):61-72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232007000100011>
3. Rivero C. Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007. 113 p.
4. Marion LFA, Sekine ES, Oliveira EC. Aberrações nucleares em eritrócitos de *Astyanax aff. paranae* como medida para avaliar a contaminação aquática na região Centro-Oeste do Paraná. *SICITE XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR.* Curitiba: Anais do XVII SICITE; 2012. p. 8.
5. Duarte PB. Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos [monografia]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011 [acesso 20 Dez 2013]. Disponível em: <http://www.microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/158.PDF>
6. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003;13(2):57-149. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)
7. Moreno P, Callisto M. Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do rio das velhas (MG). In: Ferracini VL, Queiroz SCN, Silveira MP, editores. *Bioindicadores de Qualidade de Água.* Jaguariuna (SP): EMBRAPA; 2004. p. 95-116.
8. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;31(1):9-15.
9. Hoofman RN, Raat WK. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutat Res.* 1982;104(1-3):147-52. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90136-1](http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992(82)90136-1)
10. Martins L, Paz AV, Brentano DM. Avaliação da geração de micronúcleo em juvenis de *Centropomus parallelus* (Robalo-Peva) expostos a diferentes concentrações salinas. *Rev Técnico Científica.* 2010;2(1):13-6.
11. Ramsdorf WA. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR) [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2007. 127 p.

12. Matsumoto F, Cólus I. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol.* 2000;23(2):489-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572000000200041>
13. Santos E. Peixes de água doce: vida e costumes dos peixes do Brasil. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia; 1981. 266 p.
14. Rossi SC, Silva MD, Piancini LDS, Ribeiro CAO, Cestari MM, Assis HCS. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2011;87(6):603-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-011-0397-6>
15. Nogueira DJ, Castro SC, Sá OR. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas-MG. *Rev Bras Zoociên.* 2009;11(3):227-32.
16. Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM; 2007. 501 p.
17. Alberto A, Camargo AFM, Verani JR, Costa OFT, Fernandes MN. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005;61(2):247-55. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.08.009>
18. Fagundes NA, Gastal Jr CVS. Diagnóstico ambiental e delimitação de Áreas de Preservação Permanente em um assentamento rural. *Acta Scientiarum Biological Sci.* 2008;30(1):29-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v30i1.1440>
19. Souza WFL, Knoppers B. Fluxos de água e sedimentos a costa leste do Brasil: relações entre a tipologia e as pressões antrópicas. *Geochim Bras.* 2003;17(1):57-74.
20. Vogel HF, Zawadzki CH, Metri R. Florestas ripárias: importâncias e principais ameaças. *Rev Saúde Bio.* 2009;4(1):24-30.
21. Vogel HF, Zawadzki CH, Souza VF, Cavasini R. A Influência da Formação de um Lago Artificial na composição da avifauna no Campus Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Educacional de Guarapuava (CEDETEG), Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava-PR. XVII Seminário de Pesquisa. Guarapuava (PR): Universidade Estadual do Centro-Oeste; 2005. p. 1.
22. Rodrigues ASL, Malafaia G, Castro PTA. Avaliação ambiental de trechos de rios na região de Ouro Preto-MG através de um protocolo de avaliação rápida. *Rev Est Ambientais.* 2008;10(1):74-83.
23. Tucci CEM. Gerenciamento da drenagem urbana. *Rev Bras Recursos Hídricos.* 2002;7(1):5-27.
24. Prefeitura Municipal de Guarapuava-PR. Cidade de Guarapuava. 2013 [acesso 22 Set 2013]. p. 1. Disponível: <http://www.guarapuava.pr.gov.br>
25. Tucci CEM. Águas urbanas. *Estudos Avançados.* 2008;22(63):97-112. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142008000200007>
26. Guedes JA. Poluição de rios em áreas urbanas. *Ateliê Geográfico.* 2011;5(2):212-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.5216/ag.v5i14.15488>
27. Paraná. Bacia Hidrográfica do Rio Jordão. Paraná: Instituto Ambiental do Paraná; 2008. 250 p.
28. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Infográfico – Guarapuava. 2013 [acesso 22 Set 2013]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?lang=&codmun=410940&search=parana%7Cguarapuava%7Cinfo-graficos:-dados-gerais-do-municipio>
29. Santos AF. Contribuição potencial de cargas poluentes na bacia do Rio das Pedras, no município de Guarapuava-PR. *Rev Ciên Exatas Naturais.* 2003;5(1).
30. WBCSD. World Business Council for Sustainable Development. Um futuro em transformação para o papel: seu impacto na sociedade e no meio ambiente, como a indústria do papel pode gerenciar estas mudanças, formas de tornar mais sustentável o ciclo do papel. 1996 [acesso 8 Set 2013]. Disponível em: <http://www.wbcsd.org>
31. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005. p. 1-23.
32. Crespilho FN, Santana CG, Rezende MOO. Tratamento de efluente da indústria de processamento de coco utilizando eletroflotação. *Quím Nova.* 2004;27(3):387-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000300005>
33. Barbieri E, Bondioli ACV. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquaculture Res.* 2013;44:326-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/are.12203>
34. Damato M, Barbieri E. Estudo da Toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do Cádmiio sobre o peixe *Hypessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. *Mundo Saúde.* 2012;36(4):574-81.

Recebido em: 22 de maio de 2013.

Versão atualizada em: 20 de agosto de 2013.

Aprovado em: 28 de novembro de 2013.