

Avaliação de atividade citotóxica e mutagênica em *Lithobates catesbeianus* das águas de Rios do Sudoeste do Paraná

Evaluation of cytotoxic and mutagenic activity in *Lithobates catesbeianus* from the waters of rivers in southwestern Paraná

Cassiano Aparecido de Souza¹, Patricia Aline Bressiani², Anna Karolina Gomes Oliveira³,
Elisangela Dusman⁴, Eduardo Michel Vieira Gomes⁵

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da poluição por substâncias antrópicas nas águas dos Rios de Francisco Beltrão-PR, usando o teste do micronúcleo com girinos de rã-touro. As amostras de água foram coletadas após um evento chuvoso, que aumentou a vazão dos rios. O estudo também correlacionou esses efeitos com os dados físico-químicos das amostras. As alterações nucleares encontradas nas células indicam um efeito citotóxico e estes resultados possuem correlação positiva pela análise de componentes principais (PCA) com a turbidez das águas dos rios avaliados. Além disso, a presença de micronúcleos em maior frequência sugere um efeito mutagênico, aumentando o risco de danos ao material genético das células dos anfíbios. A PCA mostrou uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos e a concentração do herbicida 2,4-D e dos hormônios estrógenos nas amostras. Diante desse cenário, é imprescindível que se adotem medidas de controle e regulação desses poluentes, para garantir a sustentabilidade ambiental dos Rios de Francisco Beltrão e mitigar os impactos negativos sobre a biodiversidade e a saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: Análise de Componentes Principais; Rio Marrecas; Rio Lonqueador; Rio Urutago.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of pollution by anthropogenic substances in the waters of the rivers of Francisco Beltrão-PR, using the micronucleus test with bullfrog tadpoles. The water samples were collected after a rainy event, which increased river flow. The study also correlated these effects with physical-chemical data from the samples. The nuclear changes found in the cells indicate a cytotoxic effect and these results have a positive correlation by principal component analysis (PCA) with the turbidity of the waters of the rivers evaluated. Furthermore, the presence of micronuclei in greater frequency suggests a mutagenic effect, increasing the risk of damage to the genetic material of amphibian cells. PCA showed a positive correlation between the frequency of micronuclei and the concentration of 2,4-D herbicide and estrogen hormones in the samples. Given this scenario, it is essential to adopt measures to control and regulate these pollutants, to guarantee the environmental sustainability of the Francisco Beltrão Rivers and mitigate the negative impacts on biodiversity and human health.

KEYWORDS: Principal component analysis; Marrecas River; Lonqueador River; Urutago River.

INTRODUÇÃO

¹ Bolsista do NAPI Sudoeste. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: cassianosouza@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 8798013956967642.

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6244294104014856.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: annoli@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2077709013393753.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Física, Estatística e Matemática. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: eduardogomes@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7293677011271209.

O rio Marrecas, no sudoeste paranaense, sofre com a poluição por substâncias químicas de diversas fontes, como indústrias, esgotos e atividades agrícolas (BIGUELINI, 2012). Esses contaminantes afetam a qualidade da água e a biodiversidade do meio aquático (KHANAL et al., 2019). Para avaliar os impactos da poluição, o uso de bioindicadores é uma ferramenta útil (WASHINGTON, 1984).

Anfíbios são exemplos de bioindicadores, pois são sensíveis a vários parâmetros ambientais e têm pele semipermeável que facilita a entrada de substâncias nocivas (WELLS, 1977). O teste do micronúcleo é um método comum para avaliar a genotoxicidade (DAS e NANDA, 1986).

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos e mutagênicos, pelo teste do micronúcleo com girinos de rã-touro, das águas do Rio Marrecas, da foz do Rio Lonqueador e Urutago, e da água tratada pela Estação de Tratamento de Água (ETA) do município de Francisco Beltrão-PR, após um grande evento chuvoso. Além disso, o estudo buscou correlacionar esses efeitos com os dados físico-químicos das amostras avaliadas.

METODOLOGIA

Foi realizada a coleta de amostras de água no dia 19 de agosto de 2022, quando o Rio Marrecas se encontrava com vazão de 254,12 m³/s.

Do Rio Marrecas foram coletadas amostras em 5 pontos ao longo do seu percurso (1, 2, 3, 6 e 7). O ponto 1 encontra-se antes do local de captação da água do Rio pela Estação de Tratamento de Água do município. O ponto 2 localiza-se sob a ponte na Avenida Duque de Caxias. O ponto 3 localiza-se sob a ponte na Avenida General Osório, no bairro Cango. O ponto 6 localiza-se sob a ponte da rodovia Olivo Zanella. O ponto 7 situa-se no bairro Padre Ulrico, após a foz do túnel de canalização do Rio Urutago (Figura 1).

O ponto 4 foi coletado na ponte do Arrudão, antes da foz do Lonqueador. E, o ponto 5 se encontra dentro do Parque de Exposições, tratando-se das águas do rio Urutago que deságua no rio Marrecas. Também foi coletada uma amostra de água residencial (ponto 8).

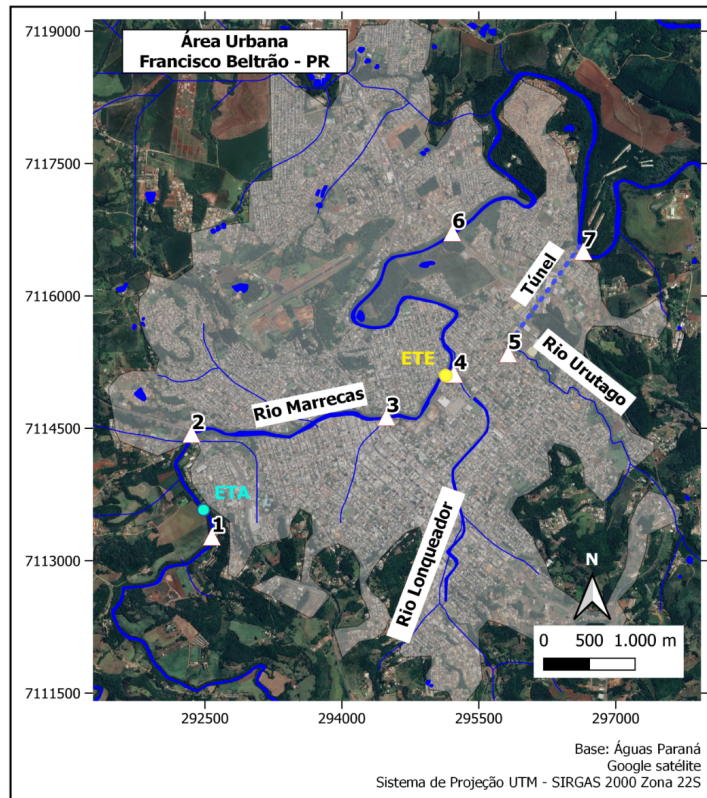
O teste do micronúcleo e outras alterações nucleares em sangue de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) foi utilizado para avaliar a mutagenicidade e a citotoxicidade das amostras. A metodologia seguiu os critérios adaptados de Gauthier et al. (2004) e Goncalves et al. (2015).

Os girinos foram obtidos de uma fonte comercial, no estágio entre 26 e 30 de Gosner. O projeto tem aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo 19.473.178-7). A sobrevivência dos girinos foi registrada a cada 24 horas. Os dados de mortalidade foram expressos em porcentagem de animais mortos no final do tratamento.

Os girinos foram aclimatados por sete dias em aquários, cada um com cinco litros de água filtrada. Depois, foram distribuídos em grupos de cinco indivíduos por aquário, com cinco litros de uma das oito amostras de água ou de água filtrada (controle negativo). O experimento crônico durou 14 dias, durante os quais os girinos foram mantidos em soluções controle e tratamento, sob temperatura de 22 ± 2 °C, aeração contínua e alimentação com ração para peixes a cada dois dias. Após esse período, os girinos foram

anestesiados, em seguida, realizou-se uma incisão na veia caudal para coletar o sangue e preparar esfregaços. As lâminas foram examinadas contando-se 1000 eritrócitos por girino. Calcularam-se o número médio e a porcentagem de micronúcleos e de alterações nucleares em cada grupo controle e tratado.

Figura 1 - Localização do Rio Marrecas e dos pontos de coleta.



Fonte: Autoria própria (2023).

O teste de normalidade e o teste de variância ANOVA indicaram o uso do teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$; $n = 5$) para comparar as médias dos grupos, com o auxílio do programa Action Stat para determinar a mutagenicidade. Para avaliar a citotoxicidade das amostras, realizou-se um teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste post-hoc de Tukey HSD.

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o programa Past 4.03, com base nos dados de citotoxicidade, mutagenicidade e nos parâmetros físico-químicos fornecidos por Bressiani (2023).

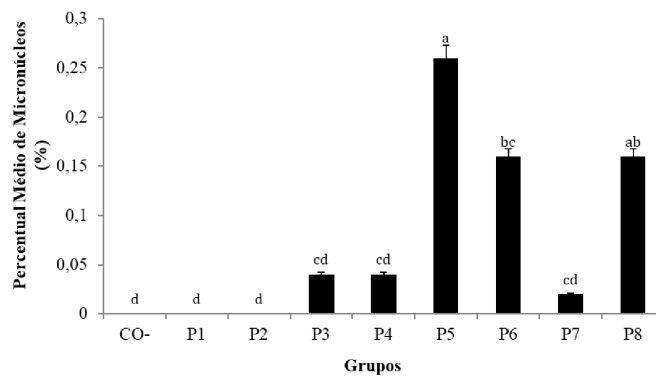
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os parâmetros de oxigênio dissolvido, temperatura e pH foram monitorados a cada 48 horas durante a exposição aos pontos amostrais para garantir a sobrevivência e desenvolvimento dos anfíbios. Não ocorreu mortalidade em nenhum dos pontos amostrais, resultando em uma taxa de mortalidade de 0%.

Em relação à porcentagem média de micronúcleos (Figura 2), os pontos 5, 6 e 8 apresentaram médias estatisticamente maiores de micronúcleos do que o controle

negativo, indicando efeito mutagênico. O ponto 5 (foz do Rio Urutago) exibiu o maior percentual, além da maior concentração de 2,4-D (224,09 µg.L-1) e a presença de hormônios estriol, estradiol, etinilestradiol e estrona, relacionando-se aos poluentes da bacia do Rio Urutago. O ponto 6 (Rio Marrecas após o deságue das águas do Rio Urutago) também mostrou alto teor de 2,4 D (196,61 µg.L-1) e hormônios estradiol, etinilestradiol e estrona. Destaca-se a mutagenicidade da água no ponto 8, abastecida pela ETA do município, com uma concentração de 2,4 D (76,55 µg.L-1) muito acima do limite permitido (< 30 µg.L-1) pela Portaria GM/MS N° 888/2021 (BRASIL, 2021) sobre a qualidade da água para consumo humano.

Figura 2 - Porcentagem média de micronúcleos do controle negativo (CO-) e dos pontos de coleta.

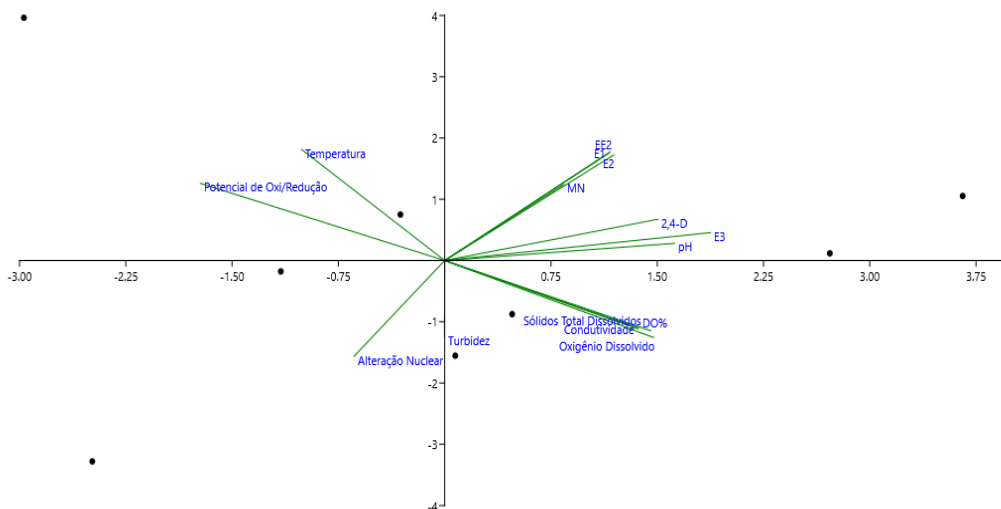


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2023).

A PCA (Figura 3) mostrou uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos em eritrócitos e a concentração do herbicida 2,4-D e dos hormônios estrógenos estrona, estradiol, etinilestradiol e estriol nas amostras de água. Esses resultados sugerem que essas substâncias podem induzir danos ao DNA em girinos expostos a elas.

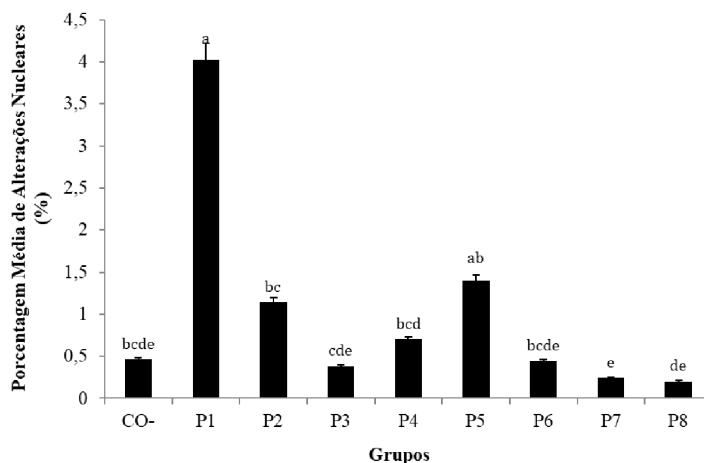
Figura 3 - Análise de componentes principais.



Fonte: Autoria própria (2023).

Com relação às alterações nucleares (Figura 4), os dados mostram que somente a amostra do ponto 1 induziu percentual médio estatisticamente maior que do controle negativo e, assim, efeito citotóxico. Isso sugere que há substâncias nas águas do Rio Marrecas, no local de captação da ETA do município, que podem prejudicar as células vivas, levando-as à morte ou à disfunção celular, o que representa um perigo para a saúde e o desenvolvimento dos girinos. As alterações nucleares observadas no ponto 1 incluíram: células binucleadas, trinucleadas, cromatina descondensada e reniforme. A PCA (Figura 3) indicou correlação positiva entre as alterações nucleares e a turbidez das amostras de água. Os dados das análises físico-químicas destes pontos de coleta confirmam que o ponto 1 apresentou elevada turbidez ($200,25 \pm 67,93$ NTU, de acordo com Bressiani, 2023).

Figura 4 - Porcentagem média de alterações nucleares do controle negativo (CO) e dos pontos de coleta.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2023).

CONCLUSÃO

O estudo evidencia a gravidade da poluição por substâncias de origem antrópica nos Rios e seus efeitos nocivos para a saúde pública. Diante desse cenário, é imprescindível que se adotem medidas de controle e regulação desses poluentes, tanto nas áreas urbanas quanto nas rurais, com o objetivo de preservar e proteger a qualidade da água e dos ecossistemas associados.

AGRADECIMENTOS

Aos Novos Arranjos de Pesquisa e Inovação (NAPI-SUDOESTE) e à Fundação Araucária pela Bolsa de Iniciação Científica, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela infraestrutura e estímulo à produção científica e tecnológica de

qualidade, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa Produtividade concedida à Profa. Dra. Elisângela Düsman (CNPq#305029/2022-3).

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BIGUELINI, C. P. **Qualidade da água e poder de depuração do rio Marrecas em seu médio e baixo curso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2012.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021**. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 mai. 2021. Seção 1, p. 42-43.

BRESSIANI, P. A. Efeito da vazão do rio Marrecas nos parâmetros físico-químicos e ecotoxicológicos de suas águas. Qualificação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2023.

DAS, R.K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish heteropneustes fossilis by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutation Research**, v. 75, p. 65 –71, 1986.

GAUTHIER, L. et al. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. **Science of The Total Environment**, v. 323, p. 47–61, 2004.

GONÇALVES, M. W. et al. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*. **Environmental Science Pollution Research**, v. 28, p. 21742–21753, 2015.

KHANAL, R. et al. Impact of holding time on toxicity change of urban road dust during runoff process. **Science of The Total Environment**, v. 668, p. 1267-1276, 2019.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices: A review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v. 18, p. 653-694, 1984.

WELLS, K. D. The social behaviour of anuran amphibians. **Animal Behaviour**, v. 25, n. 3, p. 666-693, 1977.