

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA ÁGUA DO IGARAPÉ OURO PRETO
UTILIZANDO A ESPÉCIE BIOINDICADORA *Leptodactylus petersii***

**ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF WATER FROM THE OURO PRETO
STREAM USING THE BIOINDICATOR *Leptodactylus petersii***

Fábio Dutra da Silva^{1*}, Cinthya Lopes da Silva¹, Romário Gabriel dos Reis Portes¹, Elizangela Hoffman¹, Rafaela da Silva Oliveira¹, Marcelo Martins¹, Claudilaine Oliveira da Silva² e Francisco Carlos da Silva^{3*}.

1. Docente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná – CEULJI/ULBRA, Ji-Paraná, RO, Brasil.
2. Médica Veterinária, Prefeitura Municipal de Urupá, RO, Brasil.
3. Departamento de Ciências Biológicas, CEULJI/ULBRA, Ji-Paraná, RO, Brasil.

* Autor correspondente: e-mail: fdmarques9@hotmail.com

Recebido: 26/03/2018; Aceito: 08/08/2018

RESUMO

A água é um componente essencial para a vida, tendo seu valor indeterminável. Porém, o crescente aumento populacional, as atividades urbanas, industriais, agrícolas, os desmatamentos, tem influenciado direta e indiretamente nos ecossistemas aquáticos, onde estas perturbações antrópicas têm colocado em cheque a qualidade dos recursos hídricos, pondo em risco os organismos vivos que ali habitam. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a composição físico-química das amostras de água coletada em 4 pontos do igarapé Ouro Preto, bem como avaliar a frequência de micronúcleos, e as alterações morfológicas nucleares em eritrócitos periféricos da espécie de anfíbio *L. petersii*. Para as análises dos parâmetros físico-químicos foram coletados 250 ml da água, e analisadas no Laboratório Qualitta Ambiental. Para os testes biológicos, capturou-se 24 espécimes de *L. petersii*, 6 animais por ponto monitorado, onde foram coletados 10 µL do sangue periférico por punção na veia femoral do membro posterior direito, gotejado direto nas lâminas, coradas com kit Panótico Rápido LB e contados 1000 eritrócitos por lâmina, analisando a frequência de micronúcleos, células binucleadas, brotamento e células com espículas. Através da análise físico-química, foi possível verificar eventuais impactos na qualidade da água, os dados da pesquisa mostram que parâmetros condutividade elétrica, cobre, ferro, manganês não estavam de acordo com os padrões estabelecidos pela resolução nº 357 CONAMA. O teste de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos periféricos dos indivíduos coletados nos pontos II, III, e IV, apresentou aumento significativo na frequência de anomalias indicando potencial genotóxico e mutagênico da água sob investigação.

Palavras – Chave: ecossistema, biomonitoramento, físico-químico, anomalias, *L. petersii*

ABSTRACT

Water is an essential component of life and its value is indeterminable. However, the increasing population growth, urban, industrial, agricultural, deforestation, has influenced directly and indirectly in aquatic ecosystems, where these anthropic disturbances have put in check the quality of water resources, putting at risk the living organisms that live there. The objective of the present study was to characterize the physical and chemical composition of the water samples collected in four points of the Ouro Preto creek, as well as to evaluate the micronuclei frequency and the nuclear morphological alterations in the peripheral erythrocytes of the amphibian *L. petersii* species. For the analysis of the physical-chemical parameters, 250 ml of water were collected, and analyzed in the Laboratory Qualitta Ambiental. For the biological tests, 24 specimens of *L. petersii*, 6 animals per monitored spot, where were collected 10 μ L of the peripheral blood was collected by pumping into the femoral vein of the right hind limb, dripped directly onto the slides and stained with Panopticus Quick LB kit and counted 1000 erythrocytes per slide, analyzing the frequency of micronuclei, binucleate cells, budding and spiked cells. The physico-chemical analysis allowed us to verify possible impacts on water quality. The research data show that electrical conductivity, copper, iron and manganese parameters were not in accordance with the standards established by resolution 357 CONAMA. The micronucleus test and nuclear morphological changes in peripheral erythrocytes of the individuals collected in points II, III and IV showed a significant increase in the frequency of abnormalities indicating the genotoxic and mutagenic potential of the water under investigation.

Keywords: ecosystem, biomonitoring, physico - chemical, anomalies, *L. petersii*

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, associado aos processos de urbanização, o desenvolvimento acelerado no setor industrial, a alteração no estilo de vida, juntamente com a má utilização e administração dos recursos hídricos, tem promovido uma intensa degradação ambiental, comprometendo a qualidade da água e a sobrevivência das espécies [1, 2].

Haja visto que, os ecossistemas aquáticos próximos a áreas urbanas sofrem uma deterioração progressiva com a introdução de diversas substâncias químicas [3], que são provenientes do lançamento dos esgotos domésticos, dos despejos industriais, do escoamento das chuvas nas áreas urbanas e

das águas de retorno de irrigação, como também dos acidentes ecológicos [4]. Isso tem ocasionado o aumento da contaminação por metais pesados [5, 6], como alumínio Al [7, 8], chumbo Pb e cádmio Cd [9], cobre Cu [10] e também mercúrio Hg [11]. Esses metais podem-se acumular nos tecidos dos organismos, sobretudo nas brânquias, fígado e músculos, [12, 13].

Desta forma, a bioacumulação é considerada um dos efeitos mais sérios da contaminação ambiental por metais pesados [1]. Fator este, que representa um risco para os organismos que ali habitam, podendo induzir a alterações nas funções biológicas, na estrutura das comunidades e na dinâmica das populações, afetando o seu ciclo de vida,

como também na condição reprodutiva e crescimento desses organismos [14].

A presença dessas substâncias químicas em contato direto com os organismos, podem ter ação genotóxica ou mutagênica por apresentar afinidade de ligação com o material genético [15], podendo ser tóxicas para peixes [16], moluscos [17], e anfíbios [18-22]. Para Parron [23], a caracterização físico-química da água é importante, pois procura associar os efeitos de suas propriedades às questões ambientais. No entanto, segundo Grazeffe [24], as análises físico-químicas são incapazes de fornecer dados sobre os efeitos biológicos nos organismos expostos, ainda que identifiquem a presença e as respectivas concentrações de diferentes poluentes presentes no corpo hídrico.

Porém, a avaliação e o monitoramento dos ambientes impactados não podem ser fundamentados unicamente em análises químicas de amostras ambientais, pois, os efeitos deletérios causados por contaminantes no ambiente, não são confiáveis se usar somente dessas análises [25, 26]. As análises ambientais devem ser feitas de forma integradas para serem abrangentes e eficientes, devendo ser avaliado além da qualidade da água como também as respostas dos aspectos biológicos do sistema [27].

Para detectar os efeitos dos contaminantes ambientais nos ecossistemas, diferentes organismos aquáticos vêm sendo

utilizados, como moluscos, planárias, anfíbios, peixes e plantas [28-32], realizando experimentos *in loco* ou *in vitro*, com o uso de espécies de fácil manejo [27]. Isso, porque apresentam respostas biológicas produzidas no material genético da célula, que podem ser observadas no nível fisiológico, celular e molecular [33].

Entre os animais que utilizam os corpos hídricos como habitat, os anfíbios são considerados excelentes bioindicadores, uma vez que apresentam combinações de várias características morfológicas e fisiológicas a saber: ciclo de vida com estágios aquáticos e terrestres, limitada capacidade de dispersão, área de vida geográfica restrita ao seu habitat pela sua pobre mobilidade, tegumento fino, úmido, permeável, e com ovos e embriões desprotegidos que os tornam organismos sensíveis e suscetíveis à qualidade ambiental e, portanto, vulneráveis a contaminantes ambientais [34, 35]. Embora, mesmo sendo considerados bons bioindicadores da qualidade ambiental, segundo Gonçalves [36], poucos estudos têm sido realizados com os anfíbios.

Para avaliar danos no DNA das células, existem diversos testes, sendo que, para análises ecotoxicológicas dos ambientes aquáticos um dos testes mais usados é o do micronúcleo [27]. Este teste oferece as vantagens de baixos custos, alta capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossômica), e de agentes aneugênicos

(segregação cromossômica anormal) [66]. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos caracterizar a composição físico-química das amostras de água coletada no igarapé Ouro Preto, avaliar a frequência de micronúcleos, bem como de alterações morfológicas e nucleares em eritrócitos periféricos da espécie de anfíbio *Leptodáctylus petersii* expostos na água dos pontos monitorados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A cidade de Ouro Preto do Oeste está situada na região central do estado Rondônia (Fig. 1), as margens da BR 364 a 323,3 km de Porto Velho, latitude 10° 42' S e longitude 62° 14'O, altitude de 259 metros e com uma população estimada em 2010 de 37.928 habitantes. Possui uma área de 1.969,85 km² [41]. A região apresenta um clima do tipo tropical úmido, com temperaturas médias

máximas até 32°C e médias mínimas de 13,6°C, com precipitação pluviométrica bem elevada, chegando a chover aproximadamente 2.000 mm anuais [42].

Esta cidade é um típico caso da grande deficiência em saneamento básico na Região Norte. O riacho Ouro Preto que percorre toda a cidade é destino final de efluentes líquidos urbano, agroindustrial, lançamento *in natura* de esgoto domésticos, disposição de lixos, erosão do solo e assoreamento por material carregados pelas enxurradas.

Trata-se de um importante riacho, pois ao percorrer a cidade, passa pelos principais pontos turísticos, a exemplo da Praça da Liberdade e o Bosque Municipal, também é habitat natural de inúmeros organismos como peixes, anfíbios, aves etc. Já fora do perímetro urbano, suas águas são utilizadas para dessedentar animais e abastecer tanques de piscicultura, sendo também um dos principais afluentes do Rio Boa Vista onde é feito a captação de água para o abastecimento da cidade.

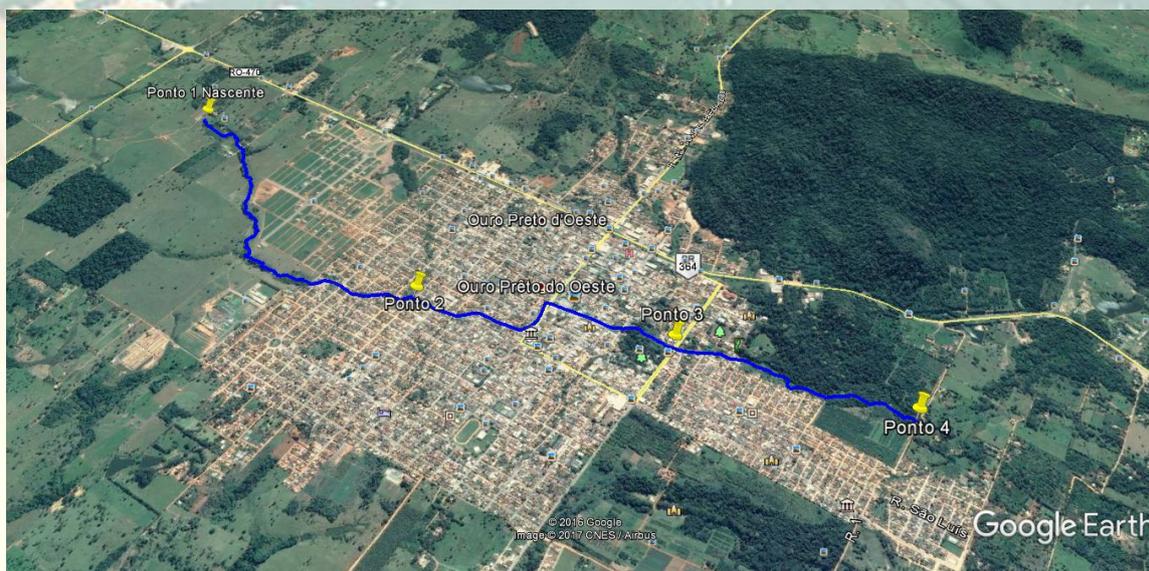


Figura 1: Imagem aérea do Município de Ouro Preto do Oeste e demarcação do Curso do igarapé Ouro Preto e pontos monitorados. Imagem Google Earth. Legenda. Pontos de coleta ●

As amostras de água para análise físico-química e material biológico dos anfíbios foram coletadas em 4 pontos demarcados no percurso do igarapé Ouro Preto conforme as coordenadas geográficas a seguir: Ponto 1 ($10^{\circ}41'53.08''S$ e $62^{\circ}16'33.23''O$) zona rural; Ponto 2 ($10^{\circ}42'55.19''S$ e $62^{\circ}15'49.76''O$) localizado na Rua Sebastião Cabral de Souza; Ponto 3 ($10^{\circ}43'22.62''S$ e $62^{\circ}15'05.87''O$) localizado na Av. Cap. Silvio Gonçalves de Farias e Ponto 4: ($10^{\circ}43'51.86''S$ e $62^{\circ}14'30.89''O$), Rua São Bernardo.

2.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Para as análises dos principais parâmetros físico-químicos, da água, amostras foram coletados no mês de outubro de 2017,

em torno de 250 ml, acondicionada em frascos de vidro esterilizado, e enviada para o Laboratório Qualitta Ambiental. Os resultados foram comparados com as normas da resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005 [43], para águas de Classe 1, que se referem a águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado e à proteção das comunidades aquáticas.

2.3 ESPÉCIE UTILIZADO COMO BIOINDICADORA

A espécie *Leptodactylus petersii* foi utilizada para a realização dos testes biológicos, sendo um organismo sentinela na avaliação da qualidade ambiental, pois apresenta uma estreita relação com ambientes

aquáticos e terrestres, assim como ampla distribuição no Brasil, a espécie pode ser uma eficiente ferramenta para a biomonitorização ambiental. Espécie comum, conhecida como rã de dedos finos de Peters, é uma espécie de rã da família Leptodactylidae [37]. Seu nome local é sapito de Peters “toadlet de Peters” [38], e pode ser encontrado nas Guianas e na Bacia Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela).

Os habitats desta espécie são florestas tropicais, borda da floresta, áreas abertas, enclaves de savana na floresta tropical e formações abertas de Cerrado. São geralmente encontrados no chão próximo de corpos d’água onde colocam seus ovos em ninhos de espuma em tanques temporários, e os girinos se desenvolvem em água lenticas [39]. Essa espécie é altamente adaptável aos habitats secundários e antropizados, e é muito comum ser encontrado em áreas urbanas, desde que existam pequenas regiões alagadiças [40].

2.4 ANÁLISE BIOLÓGICA

Foram capturados 24 espécimes no mês de agosto, durante o período noturno, sendo 6 em cada ponto escolhido para o monitoramento. Imediatamente após a captura dos animais, estes foram imobilizados com o uso das mãos e sobre uma bandeja úmida com água foram medidos (comprimento total e padrão entre 8

e 12 centímetros), e realizada a coleta do sangue periférico.

A coleta de cerca de 10 μ L do sangue periférico foi feita no local de captura, por punção na veia femoral do membro posterior direito, utilizando seringa de 1 ml c/ agulha de 13mm x 0,38 mm sendo uma seringa para cada indivíduo [2, 66]. O sangue foi gotejado direto nas lâminas, os esfregaços feito em duplicata para cada animal. Utilizou-se lâminas novas e limpas. Imediatamente após a coleta do sangue, os animais foram devolvidos ao seu habitat natural.

O material biológico foi encaminhado para o laboratório de biologia molecular do CEULJI ULBRA, para secar por um período de 12 horas em temperatura ambiente, em seguida hidratadas por 5 minutos em água destilada e posteriormente coradas utilizando o kit Panótico Rápido LB que consiste em três recipientes: primeiro 0,1% de triarilmetano, segundo 0,1% de xantenos e terceiro 0,1% tiazinas, as lâminas foram imersas 10 vezes em cada recipiente com submersão de um segundo em duração na sequência descrita acima Meneguetti [44].

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada com pH 7,0 e secas em temperatura ambiente conforme descrito por Meneguetti [44]. (Adaptado). Em cada lâmina foram contados 1000 eritrócitos analisando a frequência de micronúcleos, células binucleadas, brotamento e células com

espículas, utilizando microscópio óptico através da objetiva de 100X.

Para a análise estatística foi elaborado um banco de dados e a Análise de Variância seguida do Teste ANOVA, utilizando Tukey e para determinar o nível de significância de $p \leq 0,05$.

A metodologia adotada durante o desenvolvimento do presente trabalho foi aprovada pelo CEUA/ULBRA, Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Luterana do Brasil, sobre o protocolo 286/2017, e recebeu autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o nº 59363-1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise físico-química da água demonstrou que os parâmetros: condutividade elétrica, cobre, ferro e manganês não se enquadram nos valores de referência da Resolução CONAMA nº 357 [43] (Tabela 1). A condutividade no ponto II, III e IV apresentou valores elevados. Conforme recomendação da CETESB [45], valores acima de $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ são considerados de ambientes impactados, isso indica

possíveis modificações na qualidade da água. Porém, a resolução CONAMA nº 357/05 [43], não estabelece limites para este parâmetro.

Para Libânio [46], o aumento da condutividade, pode ser um indicativo da emissão de efluentes no corpo hídrico receptor sendo que, comumente as águas naturais apresentam valores de condutividade em torno de $100 \mu\text{S}/\text{cm}$. A condutividade elétrica caracteriza-se pela presença de íons dissolvidos na água, podendo dizer que é a capacidade de a água conduzir corrente elétrica [47].

Em relação ao parâmetro Cobre (Cu), os 4 pontos monitorados apresentaram valores elevados se comparados ao VMP da Resolução CONAMA nº 357. Entretanto, o aumento de sua concentração no ambiente está relacionado tanto as fontes naturais quanto as antropogênicas, contudo, a ação antrópica tem sido as maiores responsáveis por elevar os níveis desse elemento em vários ecossistemas [48]. Segundo Grossel [10], quando presente em elevadas concentrações na água, esse metal, é capaz de intoxicar organismos aquáticos. O mecanismo pelo qual o cobre irá agir no organismo dependerá inicialmente de sua absorção [49].

Tabela 1. Caracterização físico-química das amostras de água coletadas no riacho Ouro Preto de Ouro Preto do Oeste.

| ELEMENTOS | Pontos de Coletas | | | | |
|-----------------------|-------------------|--------|--------|-------|-----------|
| | PI | P II | P III | P IV | VMP |
| Ph | 6,51 | 7,21 | 7,20 | 7,34 | 6-9 |
| Turbidez | 6,17 | 12,9 | 11,3 | 9,34 | 40 |
| Cond. Elétrica a 25°C | 42,87 | 172,3* | 197,6* | 188* | 100 |
| Zinco (mg/L) | 0,04 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,18 |
| Cobre (mg/L) | 0,02* | 0,04* | 0,03* | 0,02* | 0,009 |
| Ferro (mg/L) | 1,17* | 0,95* | 1,43* | 1,33* | 0,3 |
| Manganês (mg/L) | 0,12* | 0,10 | 0,15* | 0,13* | 0,1 |
| Sulfatos (mg/L) | 3,56 | 3,99 | 8,22 | 6,13 | 250 |
| Mat. Orgânica | 1,94 | 2,33 | 3,59 | 2,42 | |
| Nitrito (mg/L) | 0,81 | 0,92 | 0,45 | 0,41 | 1,0 |
| Nitrato (mg/L) | 1,06 | 4,38 | 5,11 | 5,49 | 10,0 |
| Nitrogênio Amoniacal | 0,33 | 1,16 | 2,39 | 1,57 | 3,7mg N/L |
| Alumínio (mg/L) | 0,02 | 0,02 | 0,06 | 0,01 | 0,1 |

* valores que não estão de acordo com a Resolução n° 357 do CONAMA.

VMP: Valor Máximo Permitido.

Conforme estudo da CETESB [45] sobre a qualidade das águas e suas variáveis físicas, concentrações de cobre superiores a 1,0 mg/L podem matar os microrganismos e se aplicado em sua forma de sulfato de cobre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, em dosagens de 0,5 mg/L é um poderoso algicida. Em organismos aquáticos a contaminação por cobre, leva a complicações respiratórias, altera o transporte na membrana celular, as funções mitocondriais, os processos reprodutivos [50], e inibe a atividade de enzimas específicas [51]. Entretanto acredita-se que, uma vez absorvido, o cobre induz a vários danos que podem levar à morte do organismo [49].

Por estar presente nos agrotóxicos utilizados nas atividades agrícolas, o cobre é considerado um severo poluente do solo e da

água, isso por estar associado a um grupo de metais pesados. Na água, estes compostos podem ser absorvidos e armazenados no organismo de animais e em plantas [52].

Análise realizada pela Agência Nacional de Águas (ANA, 2011b) [53], no rio Uruguai constatou que o mesmo apresentava níveis de poluição consideravelmente altos com concentração de (0,08 mg/L) de cobre. Utilizando desses dados, Benites [52], fez a avaliação do potencial mutagênico do cobre na água do rio Uruguai tendo como espécie bioindicadora o peixe *Zebrafish (D. rerio)*, e os resultados encontrados demonstraram a presença de danos genéticos do tipo micronúcleo, além de outras anormalidades morfológicas nos eritrócitos, o que caracteriza o poder contaminante deste elemento.

O parâmetro Ferro apresentou valores acima do permitido em todos os pontos de coleta. Mesmo não se constituindo tóxico, conforme CETESB [54], o ferro traz diversos problemas para o abastecimento público de água pode também conferir cor e sabor à água, assim como provocar manchas em roupas e utensílios sanitários. A alta concentração do Ferro também provoca incrustações em canalizações e a proliferação de ferro-bactéria, além da contaminação biológica da água na própria rede de distribuição.

No ponto I, III e IV o Manganês tem seu valor caracterizado acima do estabelecido na Resolução CONAMA nº 357, com variação entre 0,12 e 0,15. Segundo Piveli [55], este elemento tem comportamento semelhante ao do ferro na água, podendo alterar coloração e sabor. Conforme Souza [56], o consumo de água com níveis de manganês acima da média pode apresentar sintomas como rigidez muscular, tremores das

mãos e fraqueza, o excesso de manganês no organismo provoca alterações no cérebro, e ainda pode levar à impotência, pois danifica os testículos. Segundo Venzella [57], ao serem despejadas no ambiente aquático, substâncias químicas tem o potencial de perturbar o funcionamento e a estrutura dos ecossistemas naturais.

Ao que se refere aos testes biológicos, o teste do micronúcleo utilizado para analisar o índice de mutagenicidade demonstrou quatro tipos de anormalidades, a saber: presença de micronúcleo, células binucleadas, brotamentos e espículas na membrana, conforme demonstrado na Figura 2.

Os resultados demonstraram aumento significativo na frequência de micronúcleo em eritrócitos dos animais capturados nos pontos II, III, e IV em comparação com os animais capturados no ponto I (Tabela 2).

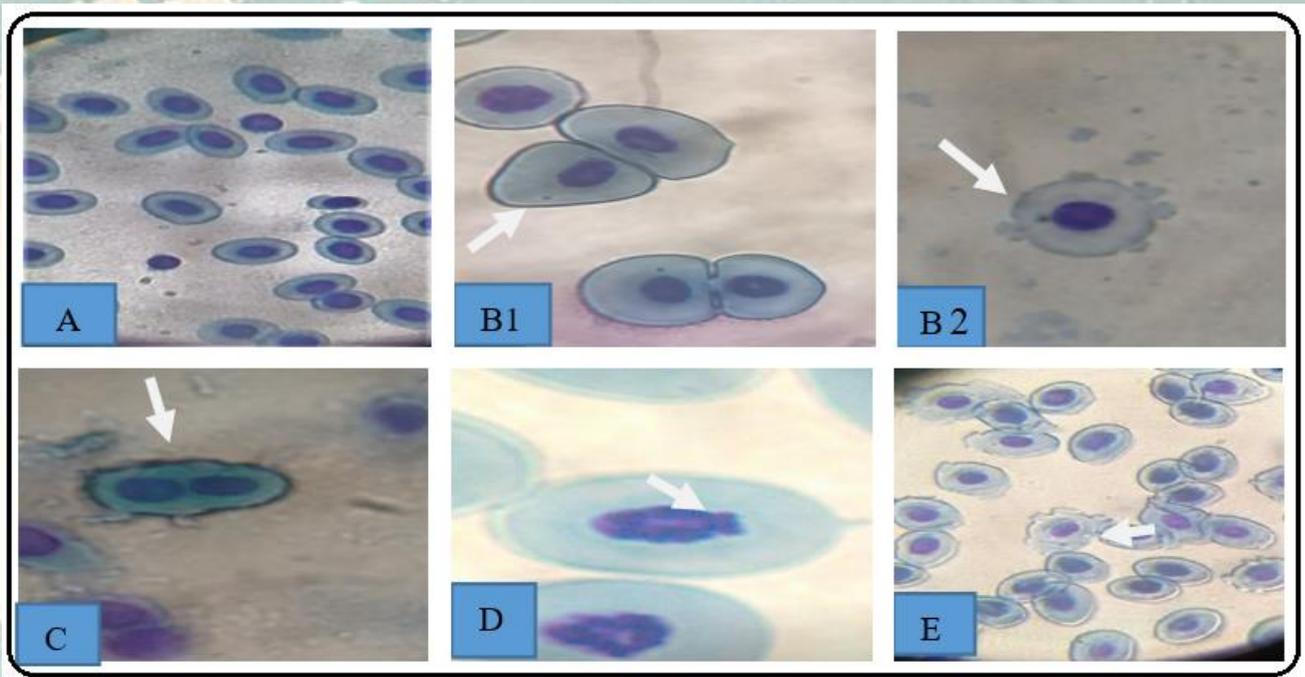


Figura 2. Micronúcleos e anormalidades morfológicas em eritrócitos de *L. petersii*; A) célula normal, B1, B2) presença de micronúcleo, C) célula binucleada, D) brotamento), E). Espiculas na membrana (Arquivo autor).

Tabela 2: Frequência de ocorrência (para cada 2000 eritrócitos analisados) de micronúcleos (MN) em eritrócitos de *L. petersii*, capturados nos pontos monitorados do igarapé Ouro Preto. Ponto 1 (fora do perímetro urbano), 2, 3 e 4 (dentro do perímetro urbano).

| Pontos | ^a MNEPC em 2000 EPC Mean ± SD |
|--------|--|
| P1 | 3,5±1 |
| P2 | 20,3±5,7*** |
| P3 | 22,2±5,3*** |
| P4 | 32,5±1,5*** |

N = 6 animais por ponto. Os animais foram capturados e liberados no mesmo local imediatamente após a coleta de sangue. ^aMNPCE: micronúcleos em eritrócitos policromáticos. *** p < 0.001: diferença significativa em comparação com o ponto 1 (fora do perímetro urbano) (teste ANOVA de Tukey).

Os espécimes coletados no ponto IV foram os que apresentaram maior número de micronúcleos, o que poderia estar relacionado provavelmente por este ponto ter influência direta da poluição urbana demonstrada conforme alterações nos parâmetros físico-químicos. Segundo IBGE [41], o município de Ouro Preto do Oeste não possui sistema de saneamento de esgoto, os efluentes são

lançados diretamente nos córregos. Segundo Boer; Hoeijmakers [15] as substâncias químicas presentes nestes efluentes apresentam afinidade de ligação com o material genético de organismos vivos, e pode promover danos ou alterações na fita de DNA, sendo chamados de agentes genotóxicos ou mutagênicos.

Conforme Caritá [1], a interação entre estas substâncias por sinergismo, as tornam muitas vezes mais tóxicas do que cada um dos seus componentes, sendo a bioacumulação um dos efeitos mais sérios da contaminação ambiental, podendo acumular nos tecidos de organismos aquáticos, principalmente nas brânquias, fígado e músculos [12, 13], dependendo dos hábitos alimentares, do tamanho e idade dos indivíduos, bem como do habitat da espécie [1].

Em estudo realizado por Gonçalves [2], analisou os danos genômicos em girinos de *Dendropsophus minutus* e *Physalaemus cuvieri* amostrados em áreas antropizadas e naturais, através do ensaio cometa e teste do micronúcleo. O mesmo autor relata que as amostras provenientes de áreas antropizadas apresentaram as maiores extensões de danos genômicos quando comparadas com áreas não antropizadas. Por se tratar de uma área de cultivo de soja e milho, Gonçalves [2] atribui o resultado ao uso demasiado de pesticidas. Esse resultado pode ser utilizado como parâmetro para fundamentar o alto índice de

anomalias demonstrada no ponto II, III e IV do nosso estudo.

Não obstante, para o município de Ji-Paraná, que se encontra a 45 km de Ouro Preto do Oeste, estudos semelhantes foram realizados por Da Silva [40], utilizando apenas uma pequena fração de células da epiderme da mesma espécie bioindicadora, onde seus resultados corroboram com os que foram encontrados por esta pesquisa. Desta forma, pode-se dizer, que os efeitos antrópicos da ação do homem na região central do estado de Rondônia frente aos recursos hídricos já refletem nos organismos que habitam esses ecossistemas.

As Células binucleadas e brotamentos são anomalias que podem ser observadas no teste cego para análise de MN. Como mostra a figura 3, o resultado apresenta uma relevante incidência de binucleação nos eritrócitos dos animais capturados nos pontos II, III e IV, com diferença significativa quando comparado aos animais do ponto I. Em relação ao Brotamento, foi registrado maior frequência nos animais dos pontos III e IV quando comparado ao ponto I (figura 4).

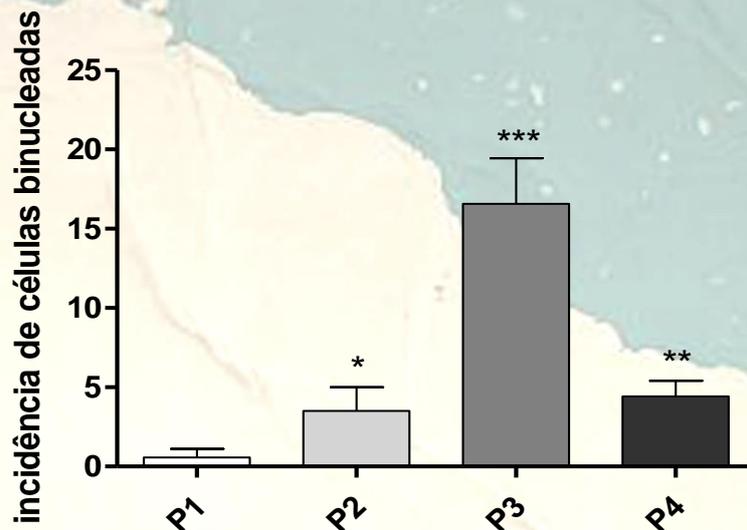


Figura 3: Incidência de células binucleadas (média e desvio padrão) encontradas em eritrócitos de *L. petersii*, capturados nos pontos monitorados do igarapé Ouro Preto. (N = 6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: diferença significativa em comparação com o ponto 1 (fora do perímetro urbano) (teste ANOVA de Tukey).

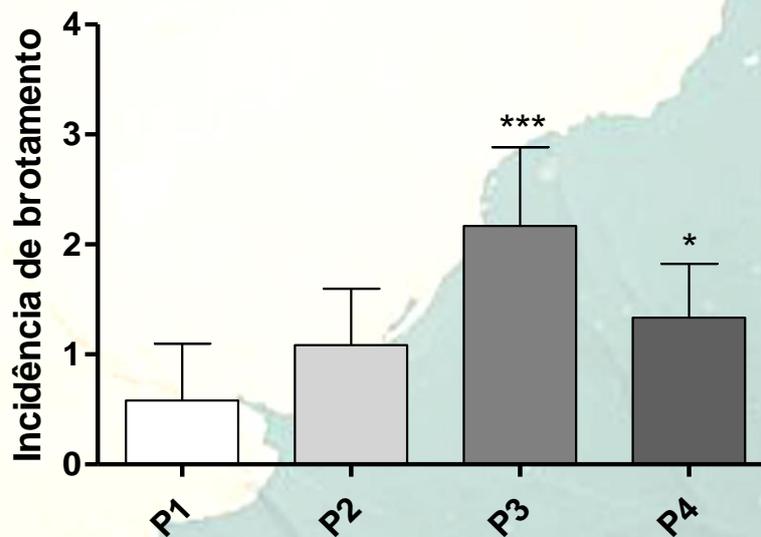


Figura 4: Incidência de brotamento nuclear (média e desvio padrão) encontradas em eritrócitos de *L. petersii*, capturados nos pontos monitorados do igarapé Ouro Preto. (N = 6), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$: diferença significativa em comparação com o ponto 1 (fora do perímetro urbano) (teste ANOVA de Tukey).

Segundo Marion [57], estas anomalias nucleares podem acontecer devido a problemas com a lâmina nuclear. A lamina é uma classe especial de subunidades proteicas

filamentosas interconectadas localizada no lado interno da membrana nuclear, esta estrutura confere o formato oval regular e a estabilidade ao envelope [58].

Longwell e Yergenian [60], sugerem que o brotamento seja uma fase preliminar de formação do micronúcleo que durante a interfase se separaria do núcleo principal. Porém, segundo Silveira [61], o brotamento nuclear é uma estrutura que se parece com um micronúcleo, porém encontra-se presa ao núcleo celular por uma fina conexão nucleoplástica.

Estudos de Ayllón & Garcia-Vazquez [59], mostraram que as alterações morfológicas nucleares são induzidas por compostos genotóxicos que afetam o genoma causando quebras do DNA. Conforme Dearfield [62], este agravante pode acarretar na perda de material genético, trocas de cromátides irmãs, e lesões que caso não sejam reparadas, induz a mutações que desencadeiam processos carcinogênicos. Agindo sobre os sistemas biológicos os agentes agressores provocam a perda da homeostase e da morfostase celular, levando a perder sua viabilidade [64]. Os agentes genotóxicos também provocam um comprometimento dos níveis celulares de respiração aeróbica, da síntese proteica,

manutenção da integridade das membranas celulares, como também da manutenção da capacidade de multiplicação celular por interferências no RNA e DNA [63]. De acordo com Marion [57], análogas aos micronúcleos as alterações morfológicas nucleares têm sido interpretadas como lesões nucleares.

A presença das espículas nas membranas dos eritrócitos (figura 2 C e E), foram observadas casualmente durante a contagem das anomalias. Esta anomalia apresenta grande incidência nos eritrócitos dos animais coletados no ponto 3 e 4 (figura 5). As membranas destas células apresentam descaracterização apresentando a formação de bolhas com variados tamanhos, como também eritrócitos com a membrana em situação de lise total. Estas anomalias são semelhantes aos acantócitos, que são eritrócitos com espículas desproporcionais e heterogêneas, facilmente identificáveis na rotina hematológica [65].

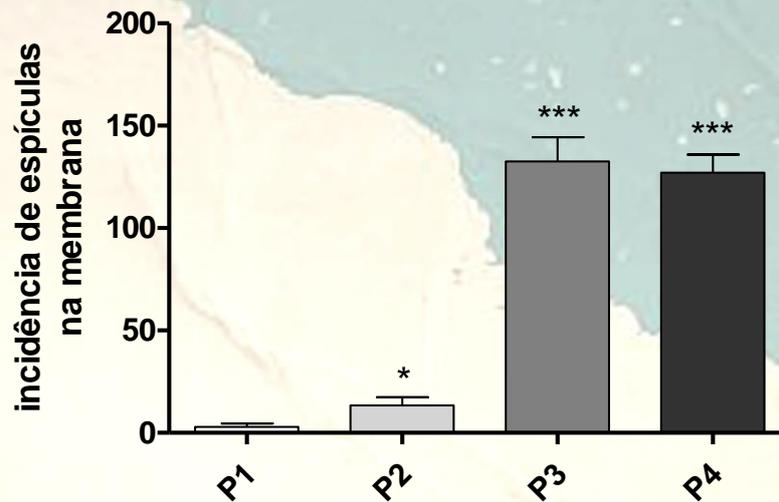


Figura 5: Incidência de alterações celulares (espículas na membrana) (média e desvio padrão) encontradas em eritrócitos de *L. petersii*, capturados nos pontos monitorados do igarapé Ouro Preto. (N = 6), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$: diferença significativa em comparação com o ponto 1 (fora do perímetro urbano) (teste ANOVA de Tukey).

Conforme Zakeri e Lockshin [67], quando uma célula sofre qualquer insulto ou injúria grave à sua existência, sua integridade e permeabilidade de membrana como também seus mecanismos de geração de ATP ficam comprometidos. Para Hoshina [68], os insultos e injúrias são causadas por agentes agressores físicos (ação mecânica, radiação, efeitos magnéticos, temperatura, eletricidade), químicos (substâncias tóxicas e não tóxicas), e biológicos (toxinas bacterianas, micóticas, parasíticas, infecções viróticas, etc). E como consequências dessas injúrias, as funções mitocondriais e dos canais iônicos do sistema de membranas das células tornam-se totalmente comprometidos, provocados pela lise celular que ocorreu pela ação de toxinas ou componentes químicos tóxicos, o que caracteriza-se como necrose celular. Segundo

Ventura [64], a necrose é um tipo de morte celular acompanhada por um rápido efluxo de constituintes celulares no espaço extracelular. Durante a necrose, as células primeiramente incham, a membrana plasmática se colapsa, e as células são rapidamente lisadas [64].

Esses dados corroboram com o que foi observado nos eritrócitos dos animais coletados no ponto 3 e 4. Porém, não há como afirmar que as espículas e a lise nas membranas dos eritrócitos da espécie estudada estejam relacionadas a necrose celular, o que demanda estudos mais específicos que leve a entender as causas desta anomalia. Entretanto vale ressaltar o fato de que o riacho Ouro Preto onde foram coletados estes animais ser um corpo hídrico receptor direto de agentes agressores físico, químico e biológico.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com a análise físico-química, utilizada para mensurar e caracterizar a presença de agentes estressores, foi possível constatar que o riacho Ouro Preto sofre impacto de contaminantes relacionados a ação antrópica, apresentando alterações para os parâmetros condutividade elétrica, cobre, ferro e manganês nos pontos II, III, IV.

Mediante o teste de MN foi observado elevadas taxas de alterações nucleares como: presença de micronúcleo, células binucleadas, brotamentos e células com espículas. Os altos índices de anomalias em eritrócitos da espécie

estudada, indica o potencial genotóxico e mutagênico geral da água sob investigação que pode ter sido influenciada por efluentes urbanos, industriais, agrotóxicos e esgoto doméstico que são lançados indiscriminadamente no rio sem tratamento prévio.

Assim, os resultados encontrados neste trabalho servem como base para verificar a interferência da poluição da água sobre os aspectos biológicos dos anuros ressaltando os perigos para toda a fauna, como para a saúde humana. É importante destacar a necessidade de um monitoramento contínuo da qualidade desse ambiente hídrico, utilizando outras espécies tanto animal quanto vegetal.

5. REFERÊNCIAS

[1] CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do polo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP.** 2010.

[2] GONÇALVES, M. W. et al. **Alterações genômicas e mutagênicas em duas espécies de anfíbios anuros.** 2015.

[3] POLLO, F. E. et al. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. **Acta toxicológica argentina**, v. 20, n. 2, p. 62-67, 2012.

[5] STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; Knasmüller, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis, New York**, v.31, p.183-191, 1998.

[6] MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. **Environmental Research, San Diego, Section A**. v.88, p. 30-35, 2002.

[7] KREWSKI, D.; YOKEL, R.A.; NIEBOER, E.; BORCHELT, D.; COHEN, J.; HARRY, J.; KACEW, S.; LINDSAY, J.; MAHFOUZ, A.M.; RONDEAU, V. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of toxicology and environmental health, Washington**, v.10, p.1-269, 2007.

[8] ACHARY, V.M.M.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety, New York**, v.70, p.300-310, 2008.

[9] FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMASGAUDOT, E.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem

activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany, Elmsford**, v.58, p.253–260, 2006.

[10] GROSSEL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C, New York**, v.133, p.287-303, 2002.

[11] PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany, Elmsford**, v.52, p.199-223, 2004.

[12] BIRUNGI, Z.; MASOLA, B.; ZARANYIKA, M.F.; NAIGAGA, I.; MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry of the Earth, Oxford**, v.32, p.1350-1358, 2007.

[13] YILMAZ, F.; ÖZDEMİR, N.; DEMIRAK, A.; LEVENT T. A. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. **Food Chemistry, London**, v.100, p.830-835, 2007

[14] LOPES, M. J. N. et al. Avaliação preliminar da qualidade da água de bacias hidrográficas de Manaus utilizando o método BMWP adaptado. **SaBios**, v. 3, p. 1-9, 2008.

[15] BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis, Oxford**, v. 21, n. 3, pp. 453-460, 2000.

[16] TOMASSO, J. R.; CARMICHAEL, G. J. Acute toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the Guadalupe bass, *Micropterus treculi*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 36, n. 1, p. 866-870, 1986.

[17] ALONSO, A.; CAMARGO, J. A. 2003. Short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca). **Bulletin o**

Environmental Contamination and Toxicology. 70: 1006 – 1012.

[18] VIEIRA, M. I. 1986. Rãs: criação prática e lucrativa. **Editora do autor**. São Paulo: 380p.

[19] HECNAR, S. J. 1995. Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from southern Ontario. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 1: 2131-2137.

[20] MARCO, A.; QUILCHANO, C.; BLAUSTEIN, A. R. 1999. Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest, USA. **Environ. Toxicol. Cem.**,18:2836–2839.

[21] JOHANDDON, M.; RÄSÄNEN, K.; MERILÄ, J. 2001. Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. **Aquatic Toxicology**, 54: 1-14.

[22] CAMARGO, J. A.; ALONSO, A.; SALAMANCA, A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. **Cosmosphere**,58: 1255–1267.

[23] PARRON, L. M; MUNIZ, D. H. F.; PEREIRA, C. M. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2011.

[24] GRAZEFFE, V. S. **Estabelecimento do teste do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) expostos à radiação gama (60 Co). 2009**. Tese de Doutorado. São Paulo (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Pós-Graduação em Ciências.

[25] BARSİENE, J.; LEHTONEN, K. K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P. J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJARVI, H.; KOPECKA J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 422-436, 2006.

[26] CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.;

VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

[27] BRITO, L. O.; DA LUZ, L. D. Avaliação e monitoramento da qualidade das águas: usando análises moleculares. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, v. 3, n. 2, p. 076-090, 2015.

[28] MÁ, X. L.; COWLES, D.L.; CARTER, R. L. Effect of pollution on genetic diversity in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* and the acorn barnacle *Balanus glandula*. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 559-563, 2000.

[29] GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J. A. P.; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research**, v.497, p. 19-27, 2001.

[30] PRUSKI, A. M.; DIXON, D. R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mystilus edulis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 57, p. 127-137, 2002.

[31] GAUTHIER, L.; TARDY, E.; MOUCHET, F.; MARTY, J. Biomonitoring of the 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.

[32] PRÁ, D.; LAU, A. H.; KNAKIEVICZ, T.; CARNEIRO, F. R.; ERDTMANN, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. **Mutation Research**, v.585, n. 1-2, p. 79-85, 2005.

[33] CABANELAS, I. T. D.; MOREIRA, L. M. A. Danos citogenotóxicos em ecossistema aquático submetido a esgotamento sanitário urbano. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012.

[34] YOUNG, BRUCE E. et al. Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el Nuevo Mundo. 2004.

[35] WELLS, K. D.; SCHWARTZ, J. J. The behavioral ecology of anuran communication. In: *Hearing and sound communication in amphibians*. Springer New York, 2007. p. 44-86.

[36] GONÇALVES, MACKS WENDELL et al. Análises Mutagênicas de Anuros em Áreas de Mineração de Níquel. **Estudos**, v. 39, n. 2, p. 115-121, 2012.

[37] FROST, DARREL R. (2014). "*Leptodactylus petersii* (Steindachner, 1864)". *Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0*. American Museum of Natural History. Retrieved 8 May 2014.

[38] HEYER, R. & RODRIGUES, M.T. (2004). "*Leptodactylus petersii*". *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2*. International Union for Conservation of Nature. Retrieved 8 May 2014.

[39] ERNST, R., KONRAD, T., LINSEMAIR, K.E. AND RÖDEL, M.-O. 2007. The impacts of selective logging on three sympatric species of *Leptodactylus* in a Central Guyana rainforest. **Amphibia-Reptilia** 28: 51-64

[40] DA SILVA, F. C. O **Alerta dos Sapos**. Ciência Hoje On-line http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2092/n/o_alertados_sapos.16abril 2014. Acesso em 21 de outubro de 2017.

[41] IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Panorâmica municipal. 2010**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/ro/ouro-preto-do-oeste/panorama>>. Acesso em: 20/03/2017.

[42] CEPLAC. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. Dados meteorológicos do município de Ouro Preto do Oeste – RO. **Dados intranet**. 2013.

[43] CONAMA. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 16 agosto, 2017.

[44] MENEGUETTI, D. U. O.; Silva F. C.; Zan, R. A.; Ramos, L. J.: Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley,

western Amazon, Brazil. **J. Environment Analytic Toxicol** 2012, 2(2).

[45] CETESB, Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua>. Acessado no dia 21 de outubro de 2017.

[46] LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas, SP: **Editora Átomo**, 2005.

[47] SCHUATZ, L. C. P.; avaliação da qualidade da água do rio dourados/ms-variáveis físico-químicas, Dourados /MS: **UFGD**, 2015. 63f

[48] PEDROZO, M.F.M. 2003. Cobre. In AZEVEDO, FA e CHASIN, A.A. (eds). **Metais: Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: **editora Atheneu**. pp. 143-185.

[49] SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER, J. M.; AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback, relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology, Amsterdam**, v. 19, n. 1, p. 177-183, 2005.

[50] MARCANTONIO, A. S. Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: **Toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos**. 2015.

[51] LORZ, H.W.; McPHERSON, B.P. Effects of Koper and zinc in freshwater fish on the adaptation to sea water and ATPase activity, and effects of copper on migratory disposition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **J. Fish. Res. Board. Can.**, v.1, p.2023-2030, 1976.

[52] BENITES, L. M. et al. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. **Ciência e Natura. [Internet]**, v. 36, n. 2, p. 107-13, 2014.

[53] ANA – Agência Nacional de Águas (Brasil). Análise químico-física da água do rio Uruguai: 2011. **ANA, 2011b**. (Relatório Técnico).

[54] CETESB, Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua>. Acessado no dia 21 de outubro de 2017.

[55] PIVELI R. P.; KATO M. T. Qualidade das águas e poluição: **aspectos físico-químicos**, p. 173-181, 2006.

[56] SOUZA, L. A. "**Contaminação por Manganês**"; **Brasil Escola**. Disponível em <<http://brasilescuela.uol.com.br/quimica/contaminacao-manganes.htm>>. Acesso em 21 de outubro de 2017.

[57] MARION, L. F. A. O uso de biomarcadores genéticos em *Astyanax aff. paranae* (Pisces) para avaliar a contaminação aquática na região centro-oeste do Paraná. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**.

[58] ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERT, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. **Artmed**, 2010. p. 656.

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

[60] LONGWELL, A. C.; YERGANIAN, G. Some Observations on Nuclear Budding and Nuclear Extrusions in a Chinese Hamster Cell Culture 2. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 34, n. 1, p. 53-69, 1965

[61] SILVEIRA, S. S. **Avaliação dos danos mutagênicos através da análise de micronúcleos em eritrócitos de tartarugas marinhas no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2016.

[62] DEARFIELD, Kerry L. et al. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, n. 1, p. 121-135, 2002.

[63] KAIUOMOVA, D.; SÜSAL, C.; OPELZ, G. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Human Immunology, Heidelberg**, v. 62, p. 64-74, 2001.

[64] VENTURA, B. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida Atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. 2004.

[65] BARONE, A.; FERNANDES, A. “**Morfologia dos eritrócitos dos eritrócitos**”. Disponível em www.profbio.com.br/aulas/hemato1_03.pdf. Acesso em 28/10/17.

[66] SANTOS, P et al. Avaliação dos efeitos genotóxicos dos corpos de água temporários de um perímetro irrigado do semiárido sergipano, por meio do Teste SMART em *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830) e do teste do micronúcleo em anfíbios de *Hypsiboas creptans* (WIED-NEUWIED, 1824). 2014.

[67] ZAKERI, Z; LOCKSHIN, R. A. Cell death during development. *Journal of immunological methods*, v. 265, n. 1, p. 3-20, 2002.

[68] HOSHINA, M. M. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de efluentes de refinaria de petróleo, por meio dos sistemas testes de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 2005.