

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**FABRÍCIO ALBERTO DE SOUZA**

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO  
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO  
SEDIMENTÁVEL ORIUNDO DE INDÚSTRIAS  
SIDERÚRGICAS**

**SÃO CARLOS-SP**

**2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**FABRÍCIO ALBERTO DE SOUZA**

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE  
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTAS AO  
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO  
SEDIMENTÁVEL ORIUNDO DE INDÚSTRIAS  
SIDERÚRGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Dra. Marisa Narciso Fernandes

**SÃO CARLOS-SP**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Fabricio Alberto de Souza, realizada em 19/11/2021.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura (UFSCar)

Prof. Dr. André Luis da Cruz (UFBA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil(CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Sandra e Carlos, por terem sido minha base e sempre me incentivarem a persistir nos estudos e conquistar meus sonhos.

À professora Dr<sup>a</sup> Marisa Narciso Fernandes, pela orientação e toda dedicação o desenvolvimento da pesquisa.

À Capes pela bolsa de Mestrado concedida e necessária ao longo do desenvolvimento do projeto e CAPES e FAPESP (Proc. 2019/08491-0) pelo suporte financeiro.

À UFSCar, ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, por me proporcionarem toda a base curricular essencial para meu desenvolvimento.

À Dr<sup>a</sup> Iara da Costa Souza pelo apoio no desenvolvimento do projeto, pela oportunidade de pesquisa junto a temática do pó-preto.

À Dr<sup>a</sup> Mariana Morozeski pelo apoio nas análises bioquímicas, ensino e aconselhamento.

Ao Senhor Eraylton Moreschi, presidente da ONG SOS Juntos ES Ambiental, pela coleta do Material Particulado Atmosférico.

Ao técnico Gustavo Oda, pela ajuda e ensino e dedicação e muitas análises.

À Piscicultura Polletini – Mogi Mirim por doarem os animais para a pesquisa.

Ao DEMA – Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar pela análise de metais.

Aos professores da banca de qualificação: Dr<sup>a</sup> Diana Monteiro do Amaral, Dr. Marcelo Gustavo Paulino e Dr<sup>a</sup> Iara da Costa Souza, pelos conselhos e orientações.

Aos amigos mestrandos e doutorandos do Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar Henrique, Israel, Michelly, Carol, Lívia, Driele, William, Luana, Natália Viana, Natália Portruneli e Priscila por me auxiliarem durante vários momentos de coleta, análises e lazer. Aos amigos e amigas que o PPG-ERN/UFSCar me proporcionou e contribuíram de maneira direta ou indireta durante todo o curso.

Ao meu companheiro Witer, por sempre me apoiar e aconselhar durante todo desenvolvimento da pesquisa.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

## RESUMO

A poeira presente na atmosfera recebe o nome de material particulado atmosférico (MPA) e sua composição depende das fontes emissoras do MPA que podem ser fontes naturais ou antrópicas. A emissão e dispersão de poluentes são influenciadas pelos ventos e pelo tamanho das partículas presentes no ar. De acordo com o tamanho do MPA, partículas menores e mais leves podem continuar suspensas, mas dependendo da sua constituição essas partículas podem se agregar com mais facilidade e formar partículas maiores, denominadas MPA sedimentável (MPASe). As alterações sanguíneas, as respostas do sistema de defesa antioxidante e das enzimas relacionadas a regulação iônica nas brânquias associadas as possíveis alterações histopatológicas que podem alterar a performance da espécie frente a outros desafios ambientais e comprometer a sobrevivência da mesma foram analisadas. Apesar das altas concentrações de Fe, Al, Ti, Mn e outros metais-traço no MPASe os parâmetros hematológicos (RBC, Hct, [Hb], VCM, HCM e [HCM]) não se alteraram embora com indicação de instabilidade no DNA dos eritrócitos após exposição a  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe por 96 horas. Em relação ao sistema imunológico as respostas variaram ocorrendo aumento de linfócitos e diminuição de monócitos. Os metais presentes no MPASe não alteraram o funcionamento da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias e o equilíbrio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  plasmático se manteve, porém ocorreu diminuição de cloreto e da atividade da enzima anidrase carbônica na concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe indicando alteração do equilíbrio  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  plasmático. A enzima antioxidante catalase nas brânquias aumentou a atividade após exposição a  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe, a atividade da enzima de biotransformação GST, que atua na conjugação da glutationa reduzida (GSH) com xenobióticos, aumentou em animais expostos a  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe e o level of GSH aumentou em todos os grupos expostos ao MPASe. O biomarcador de estresse oxidativo LPO não apresentou diferenças significativas para as brânquias corroborando que os metais presentes não inibiram a atuação dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Em conclusão, os resultados deste estudo mostraram que os metais dissolvidos em meio aquático foram absorvidos pelas brânquias e, embora em níveis subletais, causaram danos genotóxicos, alterações nas respostas do sistema imunológico e antioxidantes após 96 h de exposição. Estas alterações poderiam ser prejudiciais se os animais forem expostos por longos períodos como pode acontecer no ambiente natural.

Palavras-chave: Metais, Peixes, MPASe, Ecotoxicologia, Histopatologia.

## ABSTRACT

The dust present in the atmosphere is called atmospheric particulate matter (MPA) and its composition depends on the emitting sources, which can be natural or anthropogenic. The emission and dispersion of pollutants are influenced by the wind and the size of particles present in the air. According to the size of the MPA, smaller and lighter particles can remain suspended, but depending on their constitution, these particles can aggregate more easily and form larger particles, called sedimentable MPA (MPASe). The blood alterations, responses of the antioxidant defense system and enzymes related to ionic regulation in the gills associated with possible histopathological changes which can alter the performance of the species in the face of other environmental challenges and compromise its survival were analyzed. Despite the high concentrations of Fe, Al, Ti, Mn and other trace metals in MPASe, the hematological parameters (RBC, Hct, [Hb], VCM, HCM and [HCM]) were unchanged, but some DNA instability indication in the erythrocytes was observed after exposure to 1 g.L<sup>-1</sup> of MPASe for 96 hours. Regarding the immune system, the responses varied, with an increase in lymphocytes and a decrease in monocytes. The metals present in MPASe did not alter the functioning of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase enzyme in the gills and the plasma Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> balance was maintained however, the change in the plasma Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> ratio with a decrease in chloride ion and in the activity of carbonic anhydrase enzyme at a concentration of 1 g.L<sup>-1</sup> of MPASe indicate ionic unbalance. The antioxidant enzyme catalase in the gills increased activity for after fish exposure to 0.1 g.L<sup>-1</sup> of MPASe; the activity of the biotransforming enzyme GST that acts in the conjugation of glutathione reduced (GSH) with xenobiotics increased in fish exposed to 0.1 g.L<sup>-1</sup> of MPASe and the GSH content increased all groups exposed to MPASe. The oxidative stress biomarker LPO did not show significant differences for the gills, confirming that the metals present did not inhibit the performance of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. In conclusion, the results of this study showed that the metals dissolved in the aquatic environment absorbed by the fish gills, although at sublethal level, caused genotoxic damage, change the immune system and antioxidants responses after 96 h-exposure. It could be harmful if animals are exposed for long periods as can occur in natural environment.

Key-words: Metals, Fish, SePM, Ecotoxicology, Histopathology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que demonstra como as brânquias podem atuar no contato direto com a água e as trocas gasosas nos filamentos e lamelas. Fonte: Google Imagens.....	20
Figura 2. Histopatologias branquiais nos filamento e lamelas: A. Lamela: epitélio normal, B. Descolamento epitelial, hipertrofia e dilatação capilar; C. Necrose, ruptura epitelial e hemorragia, C e D Fusão lamelar, D Constrição capilar, E Aneurisma lamelar , F Proliferação de células cloreto. Abreviações: lb – lâmina basal; cc – célula de cloreto; mu – célula mucosa; pi – célula pilar; ce – célula epitelial lamelar; svl – seio venoso lamelar; csm – canal sangüíneo marginal (Mallat, 1985, modificada por Machado, 1999).....	22
Figura 3. Sistema de defesa antioxidante removendo radicais livres e xenobióticos em células animais. Fonte: Fang, et al. (2002).....	25
Figura 4. Estrutura da metalotioneína mostrando a estrutura polinuclear com metais (laranja) ligados aos grupos cisteínas (amarelo).Fonte: (Yuan et al. 2021).....	26
Figura 5. Tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> . (Foto: Museu Nacional).....	28
Figura 6. Localização da Ilha do Boi (a) e do Complexo do Tubarão (b). Fonte: Google Maps.....	31
Figura 7. Sistema de aquários experimentais (vista superior): (a) controle, sem o material particulado atmosférico; (b) grupo exposto a 0,01 g.L <sup>-1</sup> de MPASe; (c) grupo exposto a 0,1 g.L <sup>-1</sup> MPASe e (d) grupo exposto a 1,0 g.L <sup>-1</sup> MPASe. Período de exposição: 96 horas.....	33
Figura 8. Punção venocaudal: coleta de sangue para as análises hematológicas...35	
Figura 9. Origem de micronúcleos a partir de cromossomos atrasados e fragmentos de cromossomos acêntricos durante a anáfase. (Modificado de Fenech, 2000).....	38
Figura 10. Número de eritrócitos (a), hematócrito (b), concentração de hemoglobina (c); Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (d), concentração de hemoglobina corpuscular média (e) hemoglobina corpuscular média (f) de <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão.Não	

houve diferenças significativas (Teste ANOVA One-Way e pós-teste Dunnet).....	48
Figura 11. Leucócitos no sangue de <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Neutrófilos (a e b), monócito (c) e linfócitos (d), Barra de escala = 10µm. Corante May-Grunwald-Giemsa-Wrigh (MGGW).....	49
Figura 12. Número de leucócitos totais (a) e contagem diferencial de leucócitos (b, c e d) no sangue de <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Monócitos (b), neutrófilos (c) e linfócitos (d). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. Grupo controle (0 g.L <sup>-1</sup> de MPASe), e grupos expostos à diferentes concentrações do MPASe. (n = 11). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão.* Indica diferença significativa com p < 0,05 e leucócitos totais (teste ANOVA One-Way e pós-teste de Dunnett) em relação ao controle. ....	50
Figura 13. Trombócitos no sangue de <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Barra de escala = 10µm. Corante May-Grunwald-Giemsa-Wrigh (MGGW). ....	51
Figura 14. Número de trombócitos no sangue de <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Não houve diferenças para as concentrações analisadas. Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão (Teste ANOVA One-Way e pós-teste de Dunnett).....	51
Figura 15. Concentração dos íons plasmáticos sódio (a), potássio (b) e cloro (c) em <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe e grupo controle (0 g.L <sup>-1</sup> MPASe). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. * Indica diferença significativa para 1 g.L <sup>-1</sup> de MPASe com p = 0,0128 (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) em relação ao respectivo controle (n = 11). ....	52
Figura 16. Série eritrocitária. Eritrócitos com núcleos normais (a), eritroblastos (b), com brotos nucleares (c) e núcleo em forma de ferradura (d). Escala 10 µm. Corante: May-Grunwald-Giemsa-Wrigh (MGGW).....	53
Figura 17. Alterações nucleares eritrocitárias (brotos e núcleos em forma de ferradura) e eritroblastos em <i>Oreochromis niloticus</i> após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe e grupo controle (0 g.L <sup>-1</sup> MPASe). Não houve	

diferenças significativas para os tratamentos em relação ao controle ( $p > 0,05$ ) para as alterações eritrocitárias. *Indica diferença significativa para eritroblastos na concentração de $1 \text{ g.L}^{-1}$ MPASe com $p = 0,0431$ (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste de Dunnet) Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. ( $n = 11$ ). .....	53
Figura 18. Ensaio cometa. Danos no DNA em nucleoides classificados em score 0: sem dano aparente; score 1: pouco dano; score 2: dano moderado; score 3: dano elevado e score 4: dano máximo. ....	54
Figura 19. Percentual de danos em fragmentação (a) e comprimento (b) do DNA na cauda. Score 0 (sem dano aparente), score 1 (pouco dano), score 2 (dano moderado), score 3 (dano elevado) e score 4 (dano máximo). *Indica diferença significativa na fragmentação do DNA para score 2 e 4 com $p = 0,03$ e no comprimento da cauda para score 2 com $p = 0,03$ (Teste de Kruskal-Wallis e Pós-teste de Dunn). ....	54
Figura 20. Atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (a) e $\text{H}^+$ -ATPase (b) nas brânquias de <i>O. niloticus</i> . Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. ( $n = 11$ ). Não houve diferenças significativas (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). ....	55
Figura 21. Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) nas brânquias. * Indica diferença significativa para brânquias com $p < 0,0001$ para $1 \text{ g.L}^{-1}$ (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste Dunnett's) em relação ao respectivo controle. Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. ( $n = 11$ ). ....	56
Figura 22. Atividade da enzima catalase nas brânquias. *Indica diferença significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle. Brânquias com $p = 0,0341$ para $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ (Teste Anova-OneWay; Pós-teste de Dunnett's). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. ( $n=11$ ). ....	57
Figura 23. Atividade da enzima GST em brânquias. *Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. Brânquias com $p = 0,0416$ para $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste de Dunnet's). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. ( $n=11$ ). ....	58
Figura 24. Conteúdo de glutatona reduzida em brânquias após 96 horas de exposição ao MPASe. * Indica diferenças significativas para as brânquias com $p = 0,0206$ para $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ; $p = 0,004$ para $0,1$ e $1 \text{ g.L}^{-1}$ (Teste ANOVA One-Way e Pós-	

teste de Dunnett's). Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. (n = 11). .....	59
Figura 25. Conteúdos dos resíduos de (-SH) na metalotioneína nas brânquias de <i>O. niloticus</i> após 96 horas de exposição ao MPASe. * Indica diferença significativa para 1g.L <sup>-1</sup> com p = 0,0002 (Teste Anova-OneWay e Pós-teste de Dunnett) em relação ao respectivo controle. Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. (n = 11). .....	60
Figura 26. Níveis de peroxidação lipídica em brânquias. Não houve diferenças significativas para brânquias com p>0,05 (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. (n = 11). .....	61
Figura 27. Filamento e lamelas branquiais de <i>O. niloticus</i> . L: lamela; F: filamento; CI: células indiferenciadas; CC: célula cloreto; CM: célula mucosas; CP: célula pilar; E: eritrócito; CMG: canal marginal; CB: canal basal; SVC: seio venoso central; CPV: célula pavimentosa. Corante: Azul de Toluidina. Escala 20 µm.....	63
Figura 28. Alterações histopatológicas em brânquias de <i>O. niloticus</i> após 96 horas de exposição ao MPASe. (a) Seta indica dilatação do canal marginal. (b) Seta indica dilatação do canal basal. (c) Seta indica congestão e hiperplasia lamelar. (d) Seta indica aumento do espaço intersticial no filamento. (e) Seta indica hiperplasia do filamento. (f) Seta indica hiperplasia e seta dupla indica hipertrofia do filamento. (g) Seta indica fusão total lamelar e seta dupla indica fusão parcial lamelar. (h) Seta indica proliferação de células cloreto. (i) seta indica fusão total lamelar. (j) Seta indica proliferação de células mucosas. Corante: Azul de Toluidina. Escala 20 µm. ....	64
Figura 29. Índice de alterações histopatológicas em brânquias de <i>O. niloticus</i> analisados no grupo controle 0 g.L <sup>-1</sup> e nos grupos expostos os MPASe, durante 96 horas. Não houve diferenças significativas para brânquias com p>0,05 (teste Anova One-Way e pós-teste de Dunnett).....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações histopatológicas em brânquias e Fator de Importância (Fi), de acordo com Bernet et al. (1999).....	44
Tabela 2. Metais/metaloídes constituintes do MPASe.....	45
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água coletada diariamente nos grupos controle (0 g.L <sup>-1</sup> de MPASe) e expostos à diferentes concentrações do MPASe por 96 horas. Médias e EPM. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Anidrase Carbônica

CAT – Catalase

CB – Canal Basal

CC – Células Cloreto

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CI – Células Indiferenciadas

CM – Células Mucosa

CMG – Canal Marginal

CP – Célula Pilar

CPV – Célula Pavimentosa

CRM – Célula Rica em Mitocôndria

CR – Célula Rodlet

E - Eritrócito

EPM – Erro Padrão da Média

ERO – Espécies reativas de oxigênio

F – Filamento

Fi – Fator de importância

GST – Glutathione S-Transferase

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

Hb – Hemoglobina

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

Ialt – Índice de alterações

Iorg – Índice de lesão do órgão

L - Lamela

LPO – Peroxidação Lipídica

MPA – Material Particulado Atmosférico

MPASe – Material Particulado Atmosférico Sedimentável

MT – Metalotioneína

NP – Nanopartículas

RBC – Red Blood Cells

SOD – Superóxido dismutase

SVC – Seio Venoso Central

VCM – Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. O Material Particulado Atmosférico.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2. O MPASe e seu Impacto Ambiental no Estado do Espírito Santo.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3. Biomarcadores.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1. Biomarcadores Histopatológicos.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.2. Biomarcadores Hematológicos.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.3. Biomarcadores de Genotoxicidade e Mutagenicidade.....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.4. Biomarcadores Bioquímicos:</b>	
<b>Defesas antioxidantes e Estresse Oxidativo.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3.4.1. Metalotioneína (MT).....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.5. Biomarcadores da Regulação Iônica.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4. O Animal Modelo.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Hipóteses.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Justificativa.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Material e Métodos.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Coleta do Material Particulado Atmosférico Sedimentável.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2. Delineamento Experimental.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3. Determinação das características físico-químicas da água.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4. Coleta de amostras para análise hematológica, bioquímica e     histológica.....</b>	<b>36</b>

5.5. Análises hematológicas.....	36
5.6. Determinação da concentração de íons plasmáticos.....	37
5.7. Determinação das alterações eritrocitárias e micronúcleo.....	38
5.8. Ensaio Cometa.....	38
5.9. Biomarcadores da Regulação Iônica.....	39
5.9.1. Análise das Atividades das Enzimas Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase e H <sup>+</sup> -ATPase.....	39
5.9.2. Análise da Atividade Enzima Anidrase Carbônica.....	40
5.10. Biomarcadores de estresse oxidativo.....	41
5.10.1. Preparo dos tecidos. ....	41
5.10.2. Determinação da Atividade da Catalase (CAT).....	41
5.10.3. Determinação da Atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST).....	41
5.10.4. Determinação do Conteúdo da Glutathione Reduzida (GSH) .....	42
5.10.5. Determinação da Metalotioneína.....	42
5.10.6. Determinação da Lipoperoxidação Lipídica (LPO) .....	42
6. Biomarcadores Morfológicos.....	43
7. Análise Estatística.....	44
8. Resultados.....	44
8.1. Variáveis Físico-Químicas da água dos experimentos.....	46
8.2. Hematologia.....	47
8.2.1. Eritrócitos (série vermelha).....	47
8.2.2. Leucócitos (série branca).....	48
8.2.3. Trombócitos Totais.....	51

<b>8.2.4. Íons plasmáticos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>).....</b>	<b>52</b>
<b>8.2.5. Eritroblastos e Alterações Nucleares Eritrocitárias.....</b>	<b>52</b>
<b>8.2.6. Ensaio Cometa.....</b>	<b>53</b>
<b>8.3. Atividades das enzimas relacionadas ao equilíbrio iônico.....</b>	<b>55</b>
<b>8.3.1. Atividade das enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias.....</b>	<b>55</b>
<b>8.3.2. Atividade da Enzima Anidrase Carbônica (AC).....</b>	<b>56</b>
<b>8.4. Respostas antioxidantes e estresse oxidativo das brânquias.....</b>	<b>57</b>
<b>8.5. Histopatologias nas brânquias.....</b>	<b>62</b>
<b>9. Discussão.....</b>	<b>65</b>
<b>10. Conclusão.....</b>	<b>74</b>
<b>11. Perspectivas Futuras.....</b>	<b>77</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>78</b>

## **1. Introdução**

### **1.1. O Material Particulado Atmosférico**

A poeira presente na atmosfera recebe o nome de material particulado atmosférico (MPA) e sua composição depende das fontes emissoras do MPA que podem ser fontes naturais ou antrópicas. As fontes de origem antrópica podem ser fixas (fumaças e fuligem industriais) ou móveis (fumaça de veículos automotores). A indústria metalúrgica tem sido considerada entre os maiores poluidores da atmosfera devido a emissão do material particulado (Zhang et al., 2014). No início de 2020, a produção mundial de aço bruto foi de 443 Mt sendo que o Brasil produziu 2,6 Mt de aço bruto nesse período (Siderurgia Brasil, 2020). No Brasil, o estado do Espírito Santo cresce acima da média nacional neste setor (Bradesco, 2019) e a poluição atmosférica gerada por essas indústrias é agravada pela emissão de MPA (Machado et al., 2018; Santos et al., 2017; Souza et al., 2018).

A emissão e dispersão de poluentes são influenciadas pelos ventos e pelo tamanho das partículas presentes no ar. De acordo com o tamanho do MPA, partículas menores e mais leves podem continuar suspensas, mas dependendo da sua constituição essas partículas podem se agregar com mais facilidade e formar partículas maiores, denominadas MPA sedimentável (MPASe). MPASe pode se depositar nas superfícies e causar impactos ambientais e sociais (Santos et al. 2017). O transporte aéreo dessas partículas, por fluência superficial ( $>2000 \mu\text{m}$ ) e ressuspensão ( $60\text{-}2000 \mu\text{m}$ ) aérea, é responsável pela maior parte do movimento de massa em escala local (Ravi et al., 2011). Por outro lado, partículas menores ( $<60\mu\text{m}$ ) são transportadas como suspensão atmosférica e são responsáveis pelo transporte de longo alcance em escalas regionais, continentais e globais (Chadwick et al., 1999; Prospero et al., 2002).

## 1.2. O MPASe e seu Impacto Ambiental no Estado do Espírito Santo

O impacto ambiental causado pela deposição do MPASe podem afetar o funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Nos ecossistemas terrestres, o MPASe depositado no solo pode ser absorvido pelas raízes e se bioacumular nas plantas, pode também se depositar na superfície das folhas e afetar os processos de evapotranspiração e fotossíntese. Nos ecossistemas aquáticos, o MPASe pode se tornar biodisponível na coluna d'água ou sedimentar no fundo dos corpos d'água. Nos ecossistemas aquáticos, as partículas metálicas presentes no MPASe podem estar livremente dissolvidas ou complexadas (Donahoe e Liu, 1998), serem incorporadas na biota local e bioacumuladas nos tecidos e biomagnificadas por toda a cadeia trófica (Souza et al. 2011, 2014, 2015, 2018; Arrivabene et al. 2015, 2016). Quando esses metais estão presentes no corpo dos organismos, as defesas destes animais são ativadas contra estes agentes externos e podem causar estresse fisiológico que alteram suas funções pelo realocamento de energia e, dependendo da quantidade absorvida, pode afetar sua saúde (Schreck, et al. 2016).

Estudos realizados por Souza et al. (2013) detectaram metais e metalóides em diferentes concentrações tanto na superfície como no interstício das águas e um aumento gradual da poluição nestes dois estuários da Baía de Vitória e Santa Cruz, localizados no estado do Espírito Santo e nas raízes e folhas de *L. racemosa* e *A. schaueriana* (Souza et al., 2015; Arrivabene et al., 2015, 2016).

Souza et al. (2018b) avaliaram isótopos estáveis entre 2 estuários afetados por diferentes pressões antropogênicas para tentar relacionar as atividades antropogênicas a diferentes níveis e fontes de contaminação em ambos estuários. A análise de  $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  e  $^{208}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$  confirmou que o isótopo de Pb em todas as amostras era similar às atividades metalúrgicas. Posteriormente, pesquisa conduzida por Souza et al. (2019) em três áreas de estuários da Baía de Vitória e Santa Cruz e uma área adjacente no Complexo do Tubarão, no Espírito Santo, mostrou que nanopartículas (NP) de  $\text{TiO}_2$  foram encontradas em vesículas citoplasmáticas e núcleos de células das gônadas, rim, brânquias e células do hepatopâncreas de robalo, *Centropomus parallelus* coletados na região. NP-Fe, usualmente associadas a  $\text{TiO}_2$ -NP, foram também encontradas em gônadas e brânquias de *C. parallelus*. As

dimensões das NPs foram associadas com as identificadas no MPASe coletado no complexo do Tubarão, e inferiu-se que a fonte de TiO<sub>2</sub>-NPs em *C. parallelus* com as dimensões físicas e características nanocristalográficas era a mesma do MPASe oriundo das indústrias metalúrgicas.

Souza et al. (2021a) analisaram o MPASe coletado na Ilha do Boi e foi demonstrado que ele é constituído por hematita e quartzo, e entre as nanopartículas foi encontrado aglomerados de NaCl. Nas partículas menores de MPASe (PM10 e PM32 a 45) a concentração dos metais era maior enquanto que PM250 - 425 e PM 250-150 possuíram as menores concentrações dos metais analisados. A concentração do Fe em todas frações de MPASe era cerca de 80-90% do total de metais analisados seguido do Al (7,5 a 14%), Ti e Mn em menores proporções. A análise das teias alimentares em 2 manguezais situados em Santa Cruz e Baía de Vitoria ES mostrou que transferência de metais e metalóides ocorre nas 3 cadeias tróficas (planta-carangueijo-peixe, plâncton-camarão-peixe e plâncton-ostra) e demonstrou que alguns metais se biomagnificaram nas respectivas cadeias tróficas: Planta - Carangueijo-Peixe (Al, V, Cr, Rb, Cd, Hg). Plâncton-Ostra (Zn).

### **1.3. Biomarcadores**

De acordo com Walker (1998) um biomarcador é definido como uma resposta biológica às alterações do status considerado normal para cada animal em resposta aos agentes químicos ali presentes. As alterações ambientais podem ser investigadas em uma espécie com a utilização de diversos biomarcadores para o monitoramento da qualidade da água. Para Amiard-Triquet et al (2012) os biomarcadores são importantes ferramentas na ecotoxicologia, pois podem ser usados como sinais de alerta precoce ou mudanças ambientais antes do início de danos irreversíveis em nível populacional.

Os peixes representam uma classe de organismos com grande diversidade de habitats, e estudos mostram que o impacto das atividades humanas nos ecossistemas aquáticos é responsável por mudanças relevantes na distribuição e abundância das espécies (Almeida; Ribeiro, 2013). No estudo da ecotoxicologia de

peixes há pesquisas com diversos biomarcadores tais como: comportamentais, fisiológicos, bioquímicos, mutagênicos, genotóxicos e histológicos.

De acordo com WHO (1993) os bioindicadores podem utilizados para medir os níveis dos agentes químicos e seus metabólitos ou derivados nas células, tecidos e fluidos ou medir respostas fisiológicas ou citogenéticas além de identificar um agente tóxico e caracterizar a toxicidade associada a ele através da dose-resposta em exposição aos agentes químicos.

### 1.3.1. Biomarcadores Histopatológicos

As histopatologias, que são alterações teciduais que podem ser decorrentes da exposição a xenobióticos como os metais presentes no MPASe. As histopatologias das brânquias que são órgãos que estão em contato direto com a água e podem refletir alterações do meio aquático (Figura 1). As brânquias são os órgãos responsáveis pela respiração, osmorregulação, regulação iônica e excreção de metabólitos e é constituída por filamentos e lamelas.

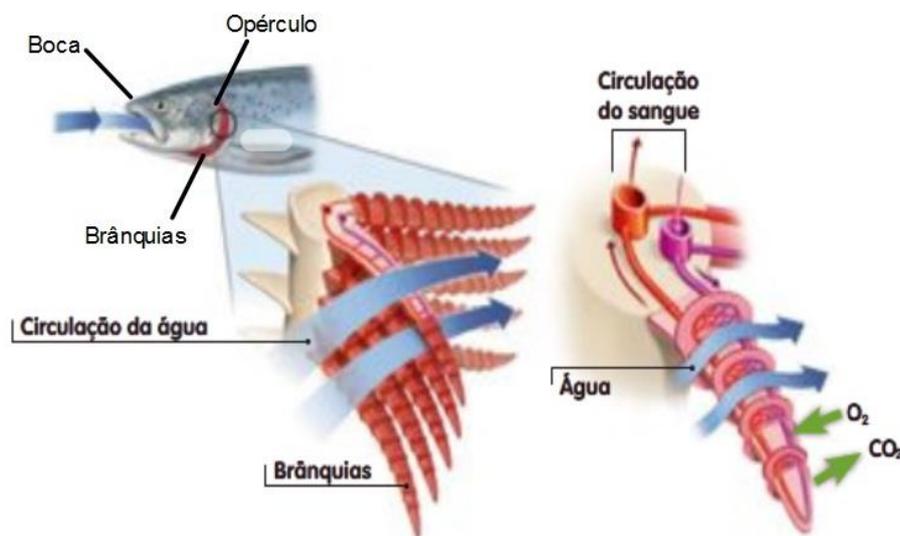


Figura 1. Esquema que demonstra como as brânquias podem atuar no contato direto com a água e as trocas gasosas nos filamentos e lamelas. Fonte: Google Imagens.

O epitélio do filamento é composto por vários tipos celulares: célula pavimentosa (CPV), célula rica em mitocôndrias (CRM) ou células cloreto (CC) que

atualmente são chamadas por ionócitos (INC), células mucosa (CM), células rodlet (CR) e células indiferenciadas (CIs). O epitélio do filamento é estratificado em 5 a 12 camadas de células. A camada externa é constituída por CPVs em sua maioria, seguido de CRM e CM. Abaixo das CPVs estão localizadas as CIs as quais se distribuem até o seio venoso. Neste epitélio também podem ser encontradas CR, porém são raras e não estão presentes em todos os peixes (Moron e Fernandes, 2014).

O epitélio lamelar é composto por duas camadas de células sendo a camada externa formada por CPVs e a camada interna formada por CIs as quais estão apoiadas pela membrana basal. A estrutura interna das lamelas é formada principalmente por células pilares, estas células possuem formações citoplasmáticas que formam os canais por onde ocorre a irrigação sanguínea (Moron e Fernandes, 2014).

Como respostas às alterações que podem ocorrer no meio aquático algumas alterações podem ocorrer nas lamelas e refletir tanto na estrutura lamelar quanto na sua composição celular. Essas alterações estão evidenciadas na Figura 2 b-d.

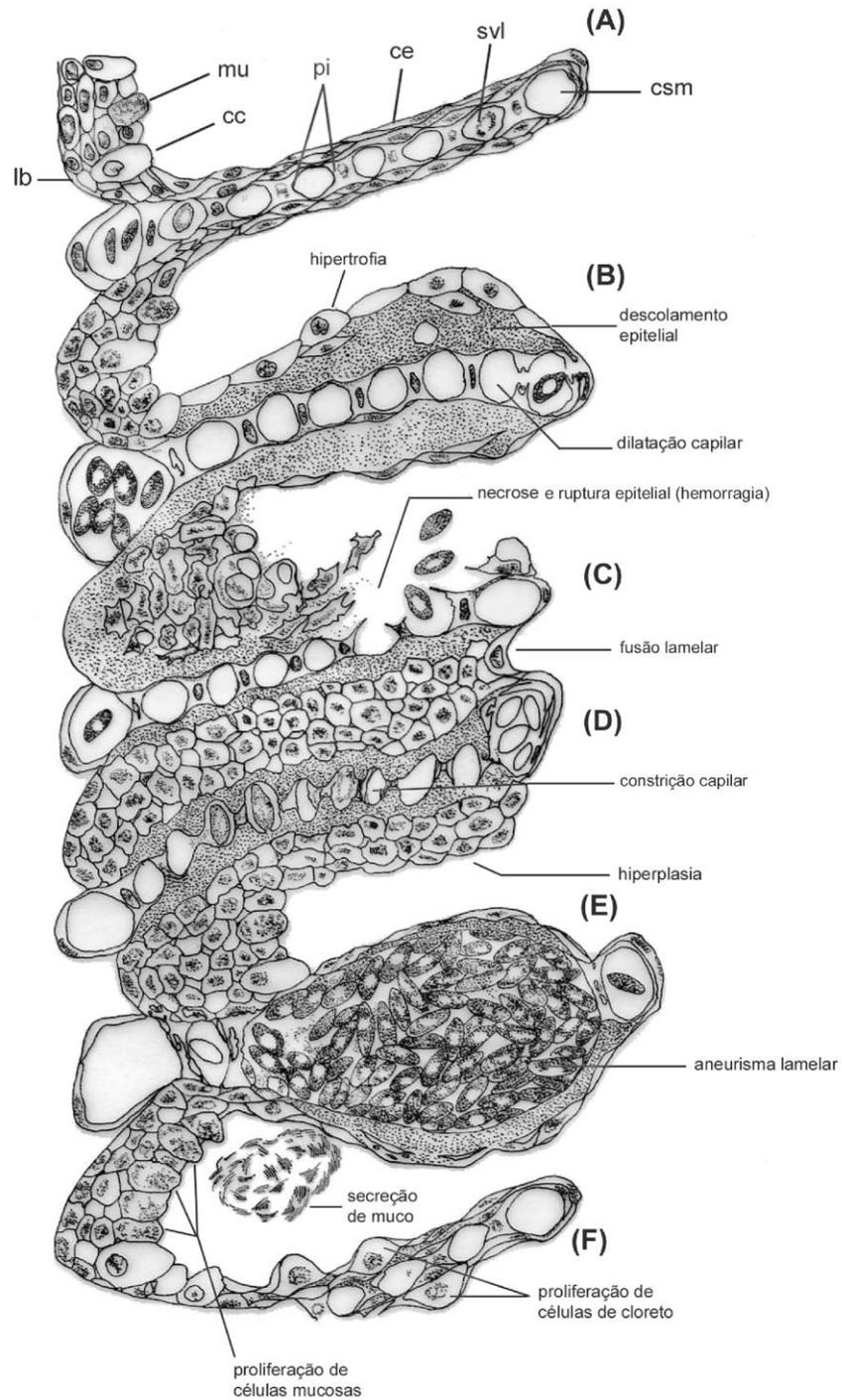


Figura 2: Histopatologias branquiais nos filamento e lamelas: A. Lamela: epitélio normal, B. Descolamento epitelial, hipertrofia e dilatação capilar; C. Necrose, ruptura epitelial e hemorragia, C e D Fusão lamelar, D Constrição capilar, E Aneurisma lamelar , F Proliferação de células cloreto. Abreviações: lb – lâmina basal; cc – célula de cloreto; mu – célula mucosa; pi – célula pilar; ce – célula epitelial lamelar; svl – seio venoso lamelar; csm – canal sangüíneo marginal (Mallat, 1985, modificada por Machado, 1999).

### **1.3.2 Biomarcadores Hematológicos**

Diversas substâncias como metais, agrotóxicos e outros poluentes quando que podem presentes na água uma vez em contato com o corpo do animal estas podem ser absorvidas e distribuída para todo o organismo, via corrente sanguínea, podendo causar alterações, tanto nas células sanguíneas (Ruas et al., 2008), quanto em órgãos nos quais podem se acumular.

As variáveis sanguíneas têm sido consideradas bons indicadores da saúde dos peixes e estão diretamente relacionadas às respostas dos peixes às variações ambientais (Campbell, 2015). As variáveis sanguíneas são importantes para o diagnóstico do status fisiológico de animais expostos a xenobióticos (Carvalho e Fernandes 2006) e alterações nos eritrócitos como aumento/diminuição do hematócrito, do número de células e da concentração de hemoglobina (Witeska, 2005) indicam efeitos adversos no transporte de O<sub>2</sub>.

A primeira linha de defesa do organismo é composta por leucócitos no sangue onde as alterações na quantidade e nos tipos celulares como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos indicam diferentes alterações no sistema imunológico (Chen et al., 2002) como respostas à xenobióticos como os metais. A intoxicação por metais pode reduzir a contagem leucócitos do sangue (Witeska, 2005). Os trombócitos estão relacionados com a coagulação sanguínea e possuem função fagocitária (Esteban et al. 2015; Corrêa et al. 2017) que, se alterados, podem afetar essas funções.

### **1.3.3. Biomarcadores de Genotoxicidade e Mutagenicidade**

Os biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade tem sido utilizados nos últimos anos para avaliar os danos que xenobióticos podem causar no DNA e nos cromossomos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Frenzilli et al., 2009). Esses xenobióticos podem ser potencialmente carcinogênicos e alterar a formação nuclear com a criação de células com micronúcleos ou alterações nucleares como núcleos em forma de ferradura e e brotos nucleares. Estas alterações são consideradas permanentes

durante o ciclo celular por não terem sido corrigidas pelos mecanismos de reparo do DNA (Fenech, 2000).

Além das alterações nucleares os danos no reparo das fitas simples e duplas também podem ser analisados através do ensaio cometa, criado por (Singh et al. 1988). Neste ensaio tanto as membranas lipídicas são lisadas e somente o nucleóide da células eucarióticas é exposto. O nucleóide é composto por cromatina adensada e na presença de xenobióticos estes podem causar danos no mecanismo de reparo que podem ser evidenciados pela quebra de fitas do DNA (Bonomo et al. 2021a). Neste ensaio os nucleóides são expostos à técnica de eletroforese, onde parte do material degradado é estendido pela corrente elétrica. A quantidade de material que migra na direção da corrente elétrica é chamado de cauda do cometa e é esta a parte da fita que sofreu danos genéticos. A quantidade que permaneceu no nucleóide é chamada de cabeça do cometa (Singh et al. 1988).

#### **1.3.4. Biomarcadores Bioquímicos: Defesas antioxidantes e Estresse Oxidativo**

O oxigênio é um gás importante no processo de respiração dos animais aeróbios, no entanto, pela sua alta reatividade, sua natureza molecular pode ser alterada transformando-o em superóxido e desencadeando processos de estresse oxidativo (Barreiros e David, 2006). Estresse oxidativo é a causa da maioria das condições fisiopatológicas, pois a maioria dos compostos xenobióticos aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres que induzem a citotoxicidade como a peroxidação lipídica que pode induzir perda de função celular, danos no DNA, inativação enzimática e oxidação dos hormônios. Estas alterações fisiopatológicas são indicadores de danos celulares oxidativos e exemplos de mecanismos tóxicos de ROS induzidas por contaminantes sendo envolvidos em processos patológicos em peixes (Ruas et al. 2008).

Como consta na Figura 3, as células animais possuem um sistema de defesa enzimática para desintoxicação de radicais livres potencialmente prejudiciais. Enzimas antioxidantes como a catalase, Cu-Zn-superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD), Mn-superóxido (Mn-SOD) e glutatona peroxidase (GPx) são a primeira linha de defesa enzimática de segunda fase do processo de desintoxicação (Ighodaro e Akinloye, 2018). Catalase e GPx decompõem peróxido de hidrogênio em hidroxilas e água. A catalase está localizada nos peroxissomos onde pode ser encontrada em

altas concentrações (Alberts et al., 2010). Cu-Zn-SOD são enzimas citosólicas que convertem superóxido para peróxido de hidrogênio (Ighodaro e Akinloye, 2018). A conjugação da glutathiona reduzida (GSH) é uma rota muito importante de desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos e são catalisados pela GST e contribuindo para eliminá-los do sistema celular (Huber et al. 2008). A maior atividade das enzimas antioxidantes e o aumento de concentrações de antioxidantes não enzimáticos como as metalotioneínas bem como das enzimas de biotransformação de fase II representam possíveis marcadores de proteção celular contra oxirradicais. Para prevenir danos causados por ROS, peixes reagem aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase e as peroxidases (Sakuragui et al. 2013; Brandão et al. 2015; Cappello et al. 2016).

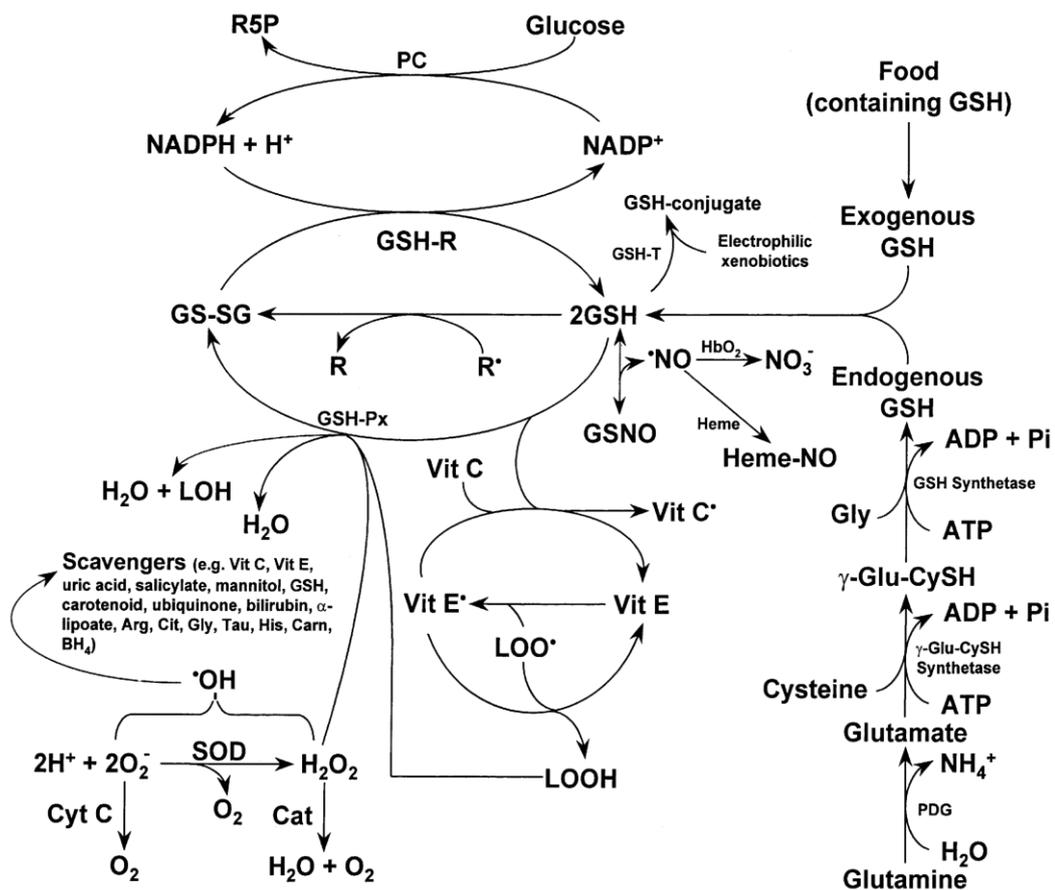


Figura 3. Sistema de defesa antioxidante para radicais livres e xenobióticos em células animais. Fonte: Fang, et al. (2002)

### 1.3.4.1. Metalotioneína (MT)

Metalotioneínas (MTs) são proteínas citosólicas de baixo peso molecular encontradas em espécies eucarióticas, ricas em grupos tiol (-SH) conhecidas por serem muito expressos em organismos encontrados em ambientes com altas concentrações de metais (Hamza-Chaffai e Amiard-Triquet, 1997; Oliveira et al. 2010). A ligação de MT aos metais representa a função associada à proteção celular contra a toxicidade de metais e é o mecanismo de defesa celular contra radicais livres. Quando o animal está exposto a metais, como o Zn, Cu, e Cd, estes causam indução de MT. Por exemplo, a MT pode proteger o DNA sequestrando o cobre e prevenindo sua participação em reações redox e pode assim prevenir a formação de radicais livres. Em geral, MTs regulam a toxicidade de vários metais e elementos traço (Nordberg, 1998).

Dependendo da sequência da metalotioneína (MT), a cinética de conjugação com metais pode ocorrer rapidamente com até com até sete íons metálicos (Figura 4) em milissegundos. Isso ocorre em processos fundamentais de células humanas na homeostase de metais como  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  e detoxificação de  $Cd^{2+}$  e  $Hg^{2+}$ , os quais em altas concentrações podem causar estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas. (Yuan et al. 2021).

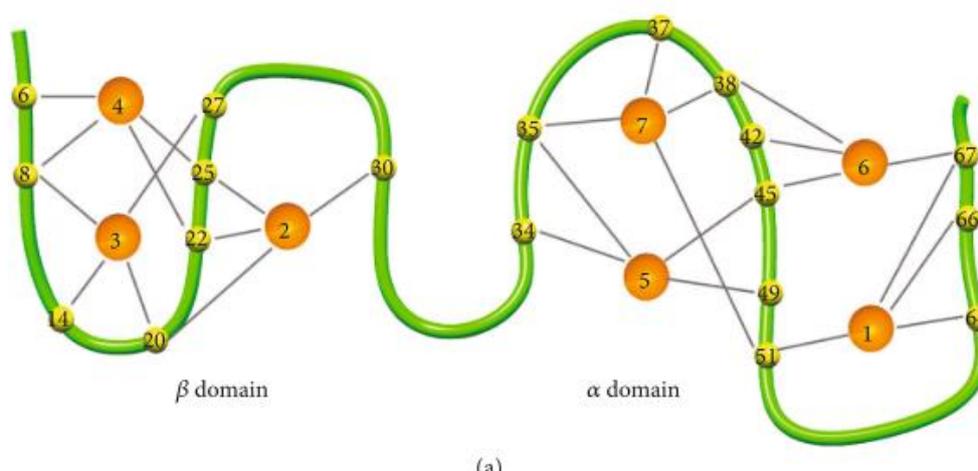


Figura 4. Estrutura da metalotioneína mostrando a estrutura polinuclear com metais (laranja) ligados aos grupos cisteínas (amarelo).Fonte: (Yuan et al. 2021)

### 1.3.5. Biomarcadores da Regulação Iônica

O impacto dos metais no organismo dos peixes pode interferir na regulação iônica (Shaw e Handy, 2011; Ribeiro et al., 2014). De acordo com Wood et al. (2015) alguns estudos descrevem como o  $\text{Cu}^{2+}$  e a  $\text{Ag}^{2+}$  não apenas competem com o  $\text{Na}^+$  por trocadores e canais de captação apical, mas também inibem a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase basolateral. A enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase energiza a captação ativa de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e também contribui para a extrusão basolateral de  $\text{Na}^+$  do citoplasma para a corrente sanguínea. A presença de metais pode inibir a atividade da anidrase carbônica intracelular nos ionócitos; esta enzima hidrata o  $\text{CO}_2$  de modo a produzir os íons  $\text{H}^+$  que normalmente são trocados por  $\text{Na}^+$  e os íons  $\text{HCO}_3^-$  que normalmente são trocados por  $\text{Cl}^-$  na membrana apical. Como resultado,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , os dois principais eletrólitos extracelulares, diminuem a concentração no plasma sanguíneo resultando em um colapso circulatório associado a mudanças de fluido ao longo do gradiente osmótico. Isso geralmente ocorre em conjunto com distúrbios do equilíbrio ácido-base e excreção de amônia, processos que dependem da extrusão apical de  $\text{H}^+$ )

### 1.4. O Animal Modelo

A tilápia-do-Nilo (Figura 5), *Oreochromis niloticus* é nativa da África, e se tornou a espécie mais cultivada em todo o mundo, inclusive no Brasil, devido à ótima relação custo/benefício para os consumidores (Silva et al., 2015). A tilápia-do-Nilo é abundante nos reservatórios brasileiros, representa hoje uma importante fonte de subsistência para pescadores artesanais (Seriani et al., 2012) e é encontrada em diversas lagoas na região de Vitória-ES (RIMA, 2017). Sendo um peixe tolerante ao cultivo em altas densidades, possuir alta resistência a doenças e ambientes poluídos, apresentar baixa demanda respiratória e sobreviver em ampla faixa de acidez da água (pH entre 6,5 e 9) (Abdel-Mohsien e Mahmoud, 2015).



Figura 5. Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. (Foto: Museu Nacional)

A Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) está sistematicamente classificada por Trewavas (1983) de acordo com o esquema abaixo:

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Sub-Família: Pseudocrenilabrinae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

## **2. Hipóteses**

Os metais/metaloídes presentes no MPASe quando absorvidos pelo peixe podem causar alterações no sangue e sistema imunológico e, nas brânquias, podem causar alterações histopatológicas, no sistema de defesa antioxidantes e processo de regulação iônica.

## **3. Justificativa**

O presente estudo é importante para compreender as primeiras alterações que podem ocorrer nos peixes quando em contato com o MPASe. As alterações sanguíneas, as respostas do sistema de defesa antioxidante e das enzimas relacionadas à regulação iônica nas brânquias associadas às possíveis alterações histopatológicas podem alterar a performance da espécie frente a outros desafios ambientais e comprometer a sobrevivência da mesma.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do MPASe na tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, após exposição de curta duração (96 h) à concentrações ambientalmente relevantes.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- a) Determinar as variáveis hematológicas em *O. niloticus* após 96 h de exposição a diferentes concentrações de MPASe
- b) Determinar a atividade das enzimas associadas à regulação iônica: anidrase carbônica e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias de *O. niloticus* após 96 h de exposição a diferentes concentrações de MPASe.
- c) Determinar a atividade do sistema antioxidante enzimático (CAT e GST) e não enzimático (GSH) em brânquias após 96 h de exposição a diferentes concentrações de MPASe.

- d) Determinar a concentração de peroxidação lipídica (LPO) em brânquias de *O. niloticus* após 96 h de exposição a diferentes concentrações de MPASe.
- e) Avaliar as alterações histopatológicas em brânquias de *O. niloticus* após 96 h de exposição a diferentes concentrações de MPASe.

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Coleta e constituição do Material Particulado Atmosférico Sedimentável**

O MPASe foi coletado na região próxima ao Complexo Tubarão, Espírito Santo, Brasil. Tubarão é um complexo minero-siderúrgico cujas atividades incluem a pelotização do minério de ferro, produção de aço com diferentes ligas metálicas, estocagem e transporte de minério de ferro e está localizado na área costeira entre as cidades de Vitória e Serra.

As coletas foram realizadas de Abril a Agosto de 2018 na Ilha do Boi (Figura 6) (20°17'03.8"S e 40°14'24.9"W), localizada a sudoeste do Complexo de Tubarão (Figura 6b), região que recebe influência direta das emissões de material particulado dos pátios de estocagem e outras unidades operacionais desse complexo industrial, as quais são carregadas pela ação de ventos e tem pouca influência de fontes móveis, como veículos automotores.



Figura 6. Localização da Ilha do Boi (a) e do Complexo do Tubarão (b). Fonte: Google Maps.

Amostras do MPASe foram analisadas e os metais constituintes foram quantificados. Para a quantificação dos metais no MPASe, as amostras foram digeridas de acordo com Chappaz et al. (2012) com 3 mL de ácido nítrico, 500  $\mu$ L de ácido clorídrico (ambos sub-boiling), 500  $\mu$ L de hidroperóxido suprapur (graduação analítica de 30%) e filtradas em filtros de nitrocelulose 0,45  $\mu$ m, de acordo com EPA et al. (1994). Todas as amostras digeridas foram transferidas para criotubos e armazenadas a 4°C até análise. A quantificação dos metais presentes nas amostras foi realizada em espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Q-ICPMS, Agilent 7500 Series CX technology) equipado com ASX-100 autosampler (CETAC-technologies, Omaha, NE, USA) no Instituto de Tecnologia e Ciência Alimentar de Córdoba (YCITAC - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 5.2. Delineamento Experimental

Juvenis machos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (n = 48, massa corpórea =  $50,43 \pm 18,68$  g; comprimento total =  $14,23 \pm 3,72$  cm e comprimento padrão =  $11,78 \pm 3,06$  cm) foram obtidos na Piscicultura Poletini, Mogi Mirim, Estado de São Paulo, Brasil). Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques de 500 L contendo água dechlorada, aeração constante, a  $25 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 12 luz : 12 escuro e foram alimentados com ração comercial própria para peixe (ACQUA Fish, 28% de proteína). Após aclimação os animais tiveram sua alimentação suspensa por 24h antes do início do experimento e foram transferidos para os aquários experimentais.

Os animais foram distribuídos em 4 grupos (n = 12 em cada grupo) em aquários com 180 L (n = 3 por aquário) com densidade máxima estabelecido OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) “*Guideline for testing of Chemicals*” (2014) de 1 g peixe.L<sup>-1</sup> água. Ao grupo controle não foi adicionado MPASe (0 g.L<sup>-1</sup> de MPASe), os demais grupos foram expostos à 0,01, 0,1 e 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPASe durante 96 horas (Figura 7). As concentrações de MPASe foram baseadas nas informações obtidas pelo Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), onde a média de deposição diária de MPA pode apresentar picos de 1,0 g/m<sup>2</sup>. As soluções do MPASe foram preparadas com a própria água do aquário e sonicadas por 30 min em banho de ultrassom para dissolução do MPASe.

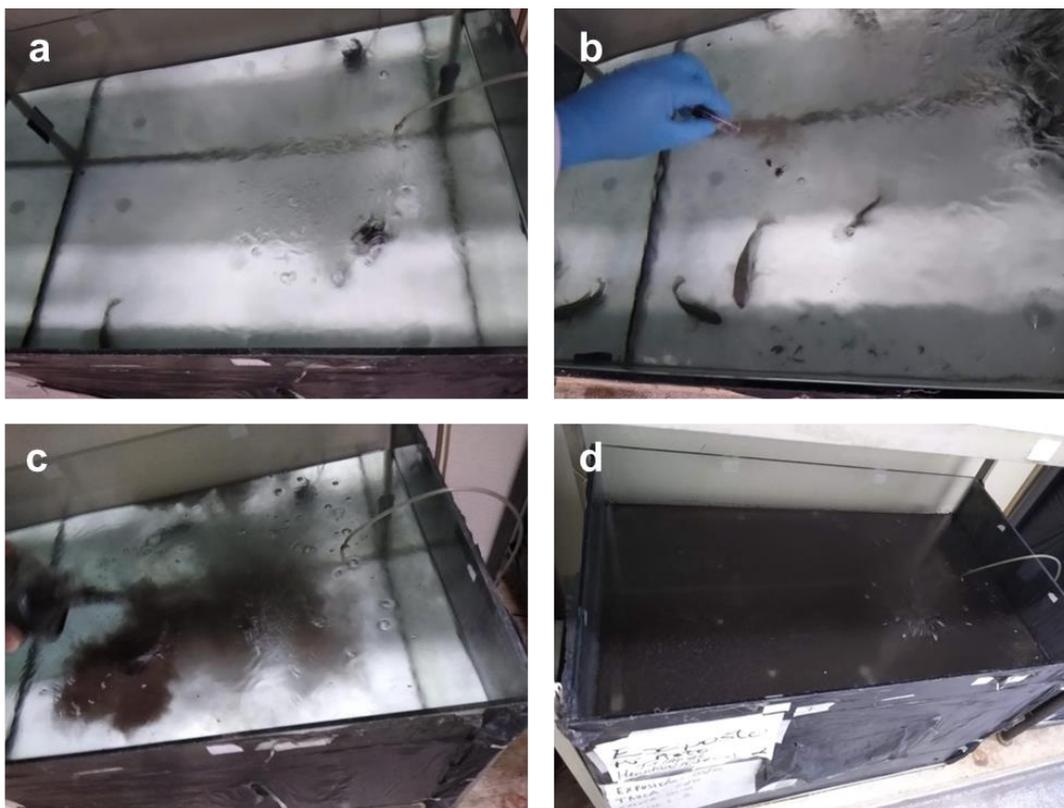


Figura 7. Sistema de aquários experimentais (vista superior): (a) controle, sem o material particulado atmosférico; (b) grupo exposto a  $0,01 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe; (c) grupo exposto a  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  MPASe e (d) grupo exposto a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  MPASe. Período de exposição: 96 horas.

Os parâmetros físico-químicos da água dos experimentos foram medidos diariamente, no tempo zero (15 minutos após adição do MPASe no aquário) e a cada 24 horas. Após 48 horas, houve renovação de 1/3 da água do aquário para manter os parâmetros físico-químicos da água.

A renovação da água foi realizada por sifonamento de 60 litros de água de cada aquário. Foi utilizado um sifão para o grupo controle e outro para o grupo exposto. O sifão foi mantido em um canto do aquário para não perturbar os animais e não retirar o material particulado decantado. A água para a renovação foi decolorada com filtro de carvão ativado e soluções do material particulado foram preparadas com esta água. A solução da renovação foi adicionada ao aquário após sonicação.

### 5.3. Determinação das características físico-químicas da água.

Os parâmetros físico-químicos: pH, condutividade e temperatura foram mensurados diretamente nos aquários experimentais com sonda multiparâmetro Orion StarTM A329 (ThermoFisher Scientific Inc.).

Para a medição do oxigênio dissolvido amostras de água foram coletadas com pipetas volumétricas de vidro, do meio da coluna d'água do aquário. Estas amostras foram mensuradas através da inserção da fibra óptica na água e os valores foram lidos pelo aparelho Fibox 3 Mini Sensor Oxygen Meter (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Alemanha).

A determinação da concentração de amônia foi realizada de acordo com Greenberg et., (1976), onde foi preparada uma curva-padrão de 5 valores, com cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) em soluções com diluições de 50% a partir da solução-mãe com 4 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl: ( 4 mg.L<sup>-1</sup>, 2 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl). De cada solução da curva, das amostras de água e do branco (água destilada) foi alíquotado 1 mL em tubos de ensaio e homogeneizado em vórtex com 200 µL do reagente Nessler (Imbralab Química e Farmacêutica Ltda., Ribeirão Preto - SP). Após 30 min, as amostras foram colocadas em cubeta de vidro e efetuada a leitura em espectrofotômetro com absorvância ajustada para 425 nm. Os valores foram convertidos em mg.L<sup>-1</sup>.

Para mensurar a alcalinidade foram coletadas amostras de 100 mL de água dos aquários experimentais. O pH inicial foi medido e utilizado o método de Golterman e Climo (1969) para a determinação da alcalinidade. Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,01 N, foi titulado na amostra até que esta atingisse o pH 4,0, em seguida o valor do volume utilizado foi anotado, calculado através da fórmula e seus resultados expressos em mg.L<sup>-1</sup>:

$$\text{Alcalinidade} = (V_1 * N * Eq) / V_a$$

Onde:

V<sub>1</sub>: Volume do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado durante a titulação;

N: Normalidade do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

Eq: Equivalente do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

Va: Volume da amostra.

#### 5.4. Coleta de amostras para análise hematológica, bioquímica e histológica

Antes dos animais serem anestesiados, amostras de sangue foram coletadas de cada peixe por punção venocaudal (Figura 8) com seringas heparinizadas para análise hematológica. Esfregaços sanguíneos foram confeccionados para contagem de leucócitos e trombócitos totais, contagem diferencial de leucócitos e alterações nucleares em eritrócitos.



Figura 8. Punção venocaudal: coleta de sangue para as análises hematológicas.

Para as análises das concentrações dos íons plasmáticos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  as amostras de sangue foram centrifugadas a  $6^\circ\text{C}$  e com rotação de 10000 g. Em seguida o plasma foi separado da série vermelha e branca e congelado a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior

análise. Após a coleta sanguínea, os peixes foram anestesiados com benzocaína e eutanasiados por secção medular para coleta dos tecidos para análises bioquímicas e histológicas. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal sob o protocolo CEUA Nº 4649170619.

### 5.5. Análises hematológicas

As amostras de sangue total foram utilizadas para determinação do hematócrito (Hct, %), número de eritrócitos (RBC,  $n.\mu\text{L}^{-1}$ ) e concentração de hemoglobina (Hb,  $\text{g.dL}^{-1}$ ). Com os valores de hematócrito e hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM,  $\mu\text{m}^3$ ), hemoglobina corpuscular média (HCM,  $\text{pg.cel}^{-1}$ ) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM,  $\text{g.dL}^{-1}$ ).

Os índices hematimétricos foram calculados a partir do valor da concentração de hemoglobina ([Hb]), hematócrito (%) e do RBC ( $n.10^6$ ) com as seguintes fórmulas:

$$\text{VCM} = \text{Hct} \times 10 = \mu\text{m}^3$$

$$\text{HCM} = ([\text{Hb}] \times 10) / \text{RBC} = \text{pg.cel}^{-1}$$

$$\text{CHCM} = [\text{Hb}] / \text{Hct} = \text{g.dL}^{-1}$$

Para o hematócrito uma amostra de sangue total coletado em tubo capilar, foi centrifugado a 11000 g, por 3 min em microcentrífuga (FANEN Centrimicro MOD.211). Os eritrócitos foram separados dos leucócitos e trombócitos e do plasma e a percentagem de eritrócitos foi determinada utilizando o cartão padrão de hematócrito. A hemoglobimetria foi realizada com o método de Drabkin (1948), em pH 7,2, no qual a determinação da hemoglobina foi feita através da oxidação do seu átomo de Fe(II) pelo ferrocianeto de potássio, formando metahemoglobina que reage com cianeto de potássio e é convertida em cianometahemoglobina, um composto estável, e sua absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro. A contagem de eritrócitos foi

efetuada com 10  $\mu\text{L}$  de sangue total fixados em 2 mL de formol-citrato (40% de formol) e a contagem de eritrócitos (RBC) foi feita em câmara de Neubauer, em duplicata. Com os valores de hematócrito e hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM,  $\mu\text{m}^3$ ), hemoglobina corpuscular média (HCM,  $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ ) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM,  $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ ).

As lâminas de esfregaços sanguíneos foram confeccionadas em duplicata colocando uma gota de sangue na lâmina e como uma outra lâmina com angulação de 45° a distensão sanguínea foi executada. Após secagem, as lâminas foram coradas com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW) por 7 minutos, lavadas em água corrente, e novamente após secagem as lâminas foram banhadas em metanol para fixação e posterior análise. Para cada peixe foi analisada 1 lâmina, escolhendo entre a duplicata aquela com melhor qualidade visual no total foram analisadas 11 lâminas por tratamento. Duzentos leucócitos foram contados diferenciando-os morfolologicamente em linfócitos, monócitos e neutrófilos, dentre os neutrófilos foram diferenciados aqueles com núcleos segmentados e as células granulocíticas especiais, de acordo com o descrito por Campbell (2015). O número total de trombócitos e leucócitos foi calculado considerando a contagem total de 5000 células sanguíneas de acordo com o método descrito por McKnight (1996).

## **5.6. Determinação da concentração dos íons plasmáticos**

O plasma foi descongelado e, 30  $\mu\text{L}$  de plasma foi diluído em 3 mL de água destilada. Com o fotômetro de chama Flamer (Digimed DM-61, Digimed, Brasil) as concentrações plasmáticas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foram quantificadas em miliequivalentes (mEq). As concentrações de  $\text{Cl}^-$  das amostras foram determinadas pelo método do tiocianato utilizando o kit cloretos (Cloretos Liquiform – Labtest, Brasil) em leitora de microplacas Molecular Devices SpectraMax M5, a 490 nm.

## 5.7. Determinação das alterações eritrocitárias e micronúcleo

As lâminas contendo esfregaços de sangue de *O. niloticus* foram examinadas também para investigar a presença eritroblastos, micronúcleos e outras anormalidades nucleares nos eritrócitos periféricos. Cada lâmina corada com solução May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW) foram avaliadas em microscópio de luz (Olympus BX 61-UCB, PA-USA) com aumento de 1000x para determinar a frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares. As alterações nucleares observadas foram classificadas em categorias de acordo com Carrasco et al. (1990), Fenech (2000) e Fenech (2007), em núcleos lobados ou em forma de ferradura. O micronúcleo foi identificado de acordo com Fenech (2000) conforme é apresentado na Figura 9.

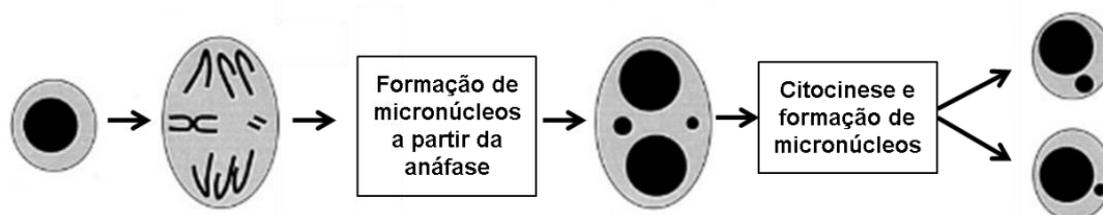


Figura 9. Origem de micronúcleos a partir de cromossomos atrasados e fragmentos de cromossomos acêntricos durante a anáfase. (Modificado de Fenech, 2000).

## 5.8. Ensaio Cometa

Para a confecção das lâminas para o ensaio cometa foram misturados 10  $\mu\text{L}$  de sangue em 120  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão. Essa mistura foi então disposta sobre uma lâmina já coberta com uma fina camada de agarose 1,5%, seguindo o protocolo de Singh et al. (1988). Após o preparo, as lâminas foram acondicionadas em cuba de eletroforese e submersas em tampão (EDTA 200mM; NaOH 10N; água deionizada a 4°C), onde permaneceram em descanso por 30 minutos, protegidas da incidência de luz. A eletroforese foi conduzida a 25V e 300 mA durante 20 minutos, no escuro. Ao final da eletroforese, as lâminas passaram por 3

banhos com água gelada, a cada 5 minutos, foram fixadas com etanol absoluto e secas a temperatura ambiente.

As lâminas foram coradas com 20  $\mu$ L de solução de Gel Red (15  $\mu$ L Gel Red 10.000X em 5 mL NaCl 1M e 45 mL de água deionizada) e imagens dos nucleóides foram capturadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX 61-UCB, PA-USA) com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm em aumento de 200 vezes. Os danos no DNA foram analisados com o software OpenComet (versão 1.3.1). Os nucleóides foram analisados a partir da migração dos fragmentos de DNA em 2 categorias: extensão da migração do DNA fragmentado (cauda do cometa) e quantidade de DNA presente na cauda. Com a análise das imagens foi calculado o percentual da cauda em relação à cabeça do cometa em cada categoria. O dano no DNA foi classificado de acordo com o comprimento da cauda do cometa formada após a corrida de eletroforese, sendo: 0 (sem dano aparente), 1 (pouco dano), 2 (dano moderado), 3 (dano elevado) e 4 (dano máximo), seguindo a classificação de Collins et al. (1995).

## **5.9. Biomarcadores da Regulação Iônica**

### **5.9.1. Análise das Atividades das Enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase**

As amostras de brânquias foram lavadas com solução salina e congeladas. Posteriormente foram homogeneizadas em tampão SEID (sacarose 150mM, EDTA 10mM, Imidazol 50mM e Desoxicolato de sódio 2,5 mM a pH 7,5) e centrifugadas por 7 minutos as 3200 g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para determinar a concentração de proteína total (Bradford (1976) para análise da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>-ATPase.

A atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ( $\mu$ mol ADP mg proteína<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup>) e da H<sup>+</sup>-ATPase ( $\mu$ mol ADP mg proteína<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) em amostras de brânquias foram determinadas simultaneamente seguindo método descrito por Gibbs e Somero (1989) adaptado para leitora de microplaca (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA).

Na microplaca de 96 poços foram adicionadas os sobrenadantes das amostras (8 amostras por microplaca), as quais foram divididas em quaduplicatas: 4 réplicas para a solução de reação, 4 réplicas para a solução com ouabaína e 4 réplicas

para a solução com NEM. Para a leitura de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase Total foi adicionada a solução de reação composta por solução de mistura (Imidazol 30 mM, NaCl 45 mM, KCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e KCN 0,4 mM), ATP 1,0 mM, NADPH 0,2 mM e frutose-1,6,difosfato 0,1 mM. Para a leitura da H<sup>+</sup>-ATPase op inibidor de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase foi adicionado aos sobrenadantes a soluçã com ouabaína e a solução de reação. E para a leitura da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase foi adicionada solução NEM (inibidor de H<sup>+</sup>-ATPase). As leituras foi realizadas com absorvância de 340 nm com intervalos de 30 segundos e e tempo máxiimo de 15 minutos. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{ATP} \cdot \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

### 5.9.2. Análise da Atividade Enzima Anidrase Carbônica

Para a determinação da atividade da anidrase carbônica (AC), amostras de brânquias foram homogeneizados em 10% da solução de reação (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, Tris-base 10 mM e fosfato de sódio monobásico 10mM em pH 7,4) e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e foi determinada a concentração de proteína pelo método de Bradford (1976) e da atividade da anidrase carbônica (AC) pelo método descrito por Vitale et al. (1999). A atividade da AC foi determinada pela adição de 7,5 mL da solução de reação em 0,05 mL de homogeneizado de tecido e 1 mL de água destilada saturada com CO<sub>2</sub> a 2,5 °C. A mudança de pH foi medida em intervalos de 4 segundos por um tempo total de 20 segundos realizada usando medidor de pH (Jenway 3510, Bibby Scientific Ltd., UK). Com resultados decrescentes do pH foi elabora uma reta de regressão do pH (variável dependente) x o tempo (variável indepéndice) para cada amostra. A declividade da reta corresponde a taxa catalisada (TC) para as amostras e a taxa não catalisada (TNC) para o branco. A TNC foi obtida pelas médias regressões lineares de cada branco como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade da Anidrase Carbônica} = (\text{TC}/\text{TNC} - 1) / \text{mg proteína}$$

## **5.10. Biomarcadores de estresse oxidativo**

### **5.10.1. Preparo dos tecidos**

As amostras de brânquias foram pesadas e diluídas em tampão fosfato 0,2M, (100 µg da amostra em 500 µL de tampão) homogeneizadas com Ultra Turrax (IKA® T10) em béquer com gelo, centrifugadas a 10000 g durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado em ultrafreezer a -80°C para análise.

### **5.10.2. Determinação da Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da catalase em brânquias foi determinada pela velocidade do consumo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com absorvância a 240 nm de acordo com protocolo de Beutler (1975). A leitura da absorvância do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das amostras de brânquias foram obtidas após 10 segundos de reação com intervalo de 2 segundos. A análise foi executada em cubeta de quartzo com capacidade para 1 mL. A reação foi realizada com adição do homogenato de brânquias em tampão de reação para catalase (tris-base 1M; EDTA 5 mM, água destilada e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) e mensuradas em 2 réplicas. O tempo de reação foi convertido de 10 segundos para 1 minuto. A atividade enzimática foi expressa em nmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizado.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>.

### **5.10.3. Determinação da Atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST)**

A determinação da atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) em brânquias foi realizada de acordo com o protocolo de Habig e Jacobi (1981) adaptado para microplaca. A análise foi realizada em microplacas adicionando-se 50 µL da amostra em 100 µL de tampão de reação (tampão fosfato 0,1 M) com CDNB (0,05 M) e 10 µL de solução de GSH (25 mM). A leitura foi realizada durante 4 minutos com intervalo de 30 segundos com absorvância de 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nanomoles de CDNB.mg de proteína<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

#### **5.10.4. Determinação do Conteúdo da Glutathiona Reduzida (GSH)**

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em brânquias e foi determinada de acordo com o protocolo de BEUTLER et al. (1963) usando reativo de Ellman (ácido 2-nitrobenzoico – DTNB), adaptado por WILHELM-FILHO (1996). A formação do ânion tiolato resultante da reação foi mensurada em espectrofotômetro a 412 nm.

#### **5.10.5. Determinação da Metalotioneína**

A determinação do conteúdo dos resíduos de sulfidril (-SH) foi realizada pelo método de Viarengo et al. (1997), utilizando o reagente de Ellman (DTNB) e leitura de absorbância a 412 nm. As amostras foram pesadas e diluídas em tampão Tris-HCl a 20 mM e pH 8,6 e homogeneizadas. O sobrenadante foi separado e após uma série de três centrifugações por 10 min a 6000 g o reagente de Ellman foi adicionado às amostras e à curva-padrão de GSH, após a última centrifugação a 3000 g durante 5 min, foi realizada a leitura a 412 nm das amostras em microplaca de 96 poços. Em seguida foi realizada a análise da concentração de proteínas das amostras pelo método de Bradford (1976) e leitura das absorbâncias à 595 nm.

#### **5.10.6. Determinação da Peroxidação Lipídica (LPO)**

A determinação da lipoperoxidação em brânquias e foi avaliada pela oxidação do  $Fe^{2+}$  na presença de xilenol laranja, em 560 nm, pelo ensaio FOX, com base no protocolo de Jiang et al. (1992). O sobrenadante das amostras foi descongelado e tratado com TCA a 12% e centrifugadas a 5000 g por 10 min a 4 °C, em seguida na microplaca foram adicionadas aos sobrenadantes das amostras o meio de reação composto por Metanol 90%, Xilenol Laranja (100  $\mu$ M),  $H_2SO_4$  (25 mM), BHT (4 mM),  $FeSO_4.NH_4$  (250  $\mu$ M). Logo após a a dição do meio de reação a microplaca foi incubada por 30 min a temperatura ambiente no escuro e em seguida as leituras das absorbâncias foram feitas a 560 nm. A análise da concentração de proteínas das amostras pelo método de Bradford (1976) e leitura das absorbâncias à 595 nm.

## 6. Biomarcadores Morfológicos

As amostras de brânquias foram lavadas em NaCl (0,9%) em seguida os 2º e 3º arcos branquiais, e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Para o preparo da inclusão as amostras passaram por uma série crescente de desidratação com etanol em diferentes concentrações: 70%, 80%, 90% e 95% sendo 1 h para cada concentração. Após a desidratação, as amostras foram colocadas em solução de etanol 95% e resina básica (Leica, Alemanha) na proporção 1:1 por 4 horas em seguida as amostras foram transferidas para solução de resina básica pura. Neste momento, a finalização da inclusão das amostras foi efetuada em moldes específicos com solução de resina e endurecedor para terminar a polimerização em estufa à 37 °C, por 24 horas. Após inclusão e polimerização da historesina, cortes histológicos foram confeccionados (3 µm de espessura) em micrótomo (Micron HM 360).

As secções histológicas de brânquias foram coradas com azul de toluidina por 1 minuto. As alterações histopatológicas, nas brânquias foram analisadas em 5 filamentos branquiais aleatórios em cada amostra e 5 campos em cada filamento. Os cortes foram examinados utilizando um microscópio de luz (Olympus BX61; Olympus, Denmark) com câmera de vídeo e acoplado a um computador com o software Plus Image Analysis (Olympus DP2-B5W).

As análises histopatológicas foram avaliadas quanto a distribuição no órgão analisado e a severidade das alterações. A cada alteração foi atribuída um escore (Sc) e um fator de importância (Fi), segundo Bernet et al. (1999), modificado por Paulino et al. (2015). O Sc indica a frequência de lesões: 0 = ausência de lesão; 1 = ocorrência rara; 2 = pouca ocorrência; 3 = moderada ocorrência; 4 = ocorrência frequente.

O fator de importância (Fi) (Tabela 1) indica como a alteração afetaria a função do órgão e a possibilidade de sobrevivência do peixe e recebeu os seguintes valores: (1) representa lesões facilmente reversíveis e com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o agente estressor é neutralizado e moderada importância patológica; (3) lesões geralmente irreversíveis e de extrema importância patológica.

Dessa forma, considerando o escore de distribuição e o fator de importância, para cada alteração, foi determinado o índice das alterações (Ialt) que é o produto do fator de importância (Fi) da alteração pelo valor do escore (Sc):  $IL = Fi \times Sc$  e o índice de lesão do órgão (Iorg) que é a somatória do IL:  $Iorg = \Sigma IL$ .

Tabela 1. Alterações histopatológicas em brânquias e Fator de Importância (Fi), de acordo com Bernet et al. (1999).

<b>Alterações histológicas</b>	<b>Fator de importância</b>
Fusão total de lamelas	1
Fusão parcial de lamelas	1
Hiperplasia do filamento	1
Descolamento do epitélio lamelar	1
Edema	1
Hipertrofia do epitélio lamelar	1
Hiperplasia do epitélio lamelar	2
Aneurisma (canal marginal)	2
Aneurisma (canal basal)	2
Aneurisma (lamelar)	2
Congestão/Hiperemia/Hemorragia	1
Dilatação canal marginal	1
Dilatação canal basal	1
Células pilares (constricção)	1
Células pilares (rupturas)*	2
Hipertrofia de células cloreto	1
Proliferação de células cloreto	1
Proliferação de células mucosas	1
Ruptura do epitélio lamelar	1
Aumento do espaço intersticial no epitélio do filamento	1
Atrofia do epitélio lamelar	2
Necrose	3
Parasitas*	1

Fi: 1 = pouca; 2 = moderada e 3 = alta

## 7. Análise Estatística

A normalidade dos dados entre os tratamentos foi analisada com o teste de Shapiro-Wilk onde definiu-se o conjunto de dados considerados normais dentro de uma distribuição Gaussiana executou-se testes paramétricos e os dados não normais foram utilizados testes não-paramétricos.

Os dados paramétricos (oxigênio dissolvido, alcalinidade, índices e dados hematológicos, íons plasmáticos, anidrase carbônica, glutaciona S-transferase, glutaciona reduzida, catalase e metalotioneína) foram analisados pelo teste ANOVA (One-Way) seguido do pós-teste paramétrico de Dunnet.

Os dados não-paramétricos (condutividade, pH, temperatura, amônia, Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-ATPase, H-ATPase e peroxidação lipídica) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste não-paramétrico de Dunn.

No pós-teste cada grupo exposto ao MPASe foi comparado com o grupo controle e o nível de diferença dos dados foi considerado para 95% de significância, ou seja  $p \leq 0,05$ . As análises estatística. foram executadas com o o software GraphPad Prism (8.0.1).

## 8. Resultados

As concentrações de metais presentes no MPASe estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Metais/metaloides constituintes do MPASe.

Elemento	Concentração $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	LOD (Low of Detection)	LOQ (Low of Quantification)
Fe-56	91929,2201	0,3919	0,9666
Fe-57	91715,5685	0,3109	0,7181
Al	11438,5780	1,2907	2,7594
Mn	1113,2246	0,0560	0,1512
Zn	882,5874	0,0053	0,6541
Cu	706,1446	0,2548	0,0841
Ti	361,8456	0,0363	0,0807
Ba	116,5554	0,0942	0,1037
Pb	93,1804	0,0423	0,0940
Sr	77,2643	0,0789	0,1360
Cr	76,7670	0,0513	0,1182
Ni	66,7846	0,0627	0,1312
V	30,9372	0,2545	0,3169
Ce	17,9253	0,0031	0,0066
Zr	14,9071	0,0224	0,0491
La	8,5344	0,0133	0,022

Y	7,1471	0,0014	0,0033
As	5,5343	0,0166	0,0148
Mo	4,2074	0,0384	0,0864
Rb	3,7972	0,3887	0,4476
Se	3,3124	0,0073	0,0406
Nb	2,2913	0,0041	0,0096
W	1,17063	0,0024	0,0069
Cd	0,8558	0,0415	0,077
Ag	LOD	0,0412	0,107
Bi	LOQ	0,0856	0,239
Hg 202	LOD	0,0401	0,0726
Hg 201	LOD	0,0905	0,1245
Au	LOD	0,0259	0,0617

A solução do MPASe ao ser depositada na água se diluiu de diferentes formas, na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> a água atingiu maior turbidez visual e parte do contaminante permaneceu na superfície da água diluindo lentamente na coluna d'água e se depositando no fundo do aquário experimental. Visualmente 0,01 g.L<sup>-1</sup> de MPASe se diluiu mais na coluna d'água do que 0,1 e 1g.L<sup>-1</sup> de MPASe.

Durante o experimento o grupo controle e os animais expostos às concentrações de 0,01 e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe apresentaram comportamento que se aproximava a territorialidade o que levou a morte de um animal de cada grupo, totalizando três animais.

### 8.1. Variáveis Físico-Químicas da água dos experimentos

As variáveis físico-químicas da água durante os experimentos estão apresentadas na Tabela 3. Houve aumento significativo para amônia (300%) e condutividade (25%) na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe após 96 horas do experimento.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água coletada diariamente nos grupos controle (0 g/L de MPASe) e expostos à diferentes concentrações do material particulado atmosférico por 96 horas. Médias e EPM.

Parâmetros	Concentrações em g.L <sup>-1</sup> de MPASe			
	0	0,01	0,1	1
pH	7,47 ± 0,08	7,75 ± 0,09	7,32 ± 0,11	7,41 ± 0,1
Temperatura (°C)	22,36 ± 0,19	25,01 ± 0,13	21,83 ± 0,23	24,85 ± 0,09
OD (mg.L <sup>-1</sup> )	8,69 ± 0,03	8,51 ± 0,05*	8,71 ± 0,03	8,54 ± 0,04
Condutividade (µS.cm <sup>-1</sup> )	52,89 ± 0,51	40,57 ± 1,8*	51,16 ± 0,3	66,37 ± 3,34*
Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )	0,81 ± 0,08	1,34 ± 0,17	0,76 ± 0,08	3,29 ± 0,27*
Alcalinidade (mg.L <sup>-1</sup> )	19,92 ± 0,89	20,29 ± 0,46	22,42 ± 0,97	22 ± 0,88

Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão.\* Indica diferença significativa (P < 0,05) em relação ao controle. Condutividade (p = 0,005) para 0,01 g.L<sup>-1</sup>, p = 0,035 para 1 g.L<sup>-1</sup>), e amônia <0,0001 para 1 g.L<sup>-1</sup> (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

## 8.2. Hematologia

### 8.2.1. Eritrócitos (série vermelha)

O número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito não apresentaram diferenças entre o controle e as concentrações de MPASe aplicadas, assim como os índices hematimétricos calculados: volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças significativas (Figura 10).

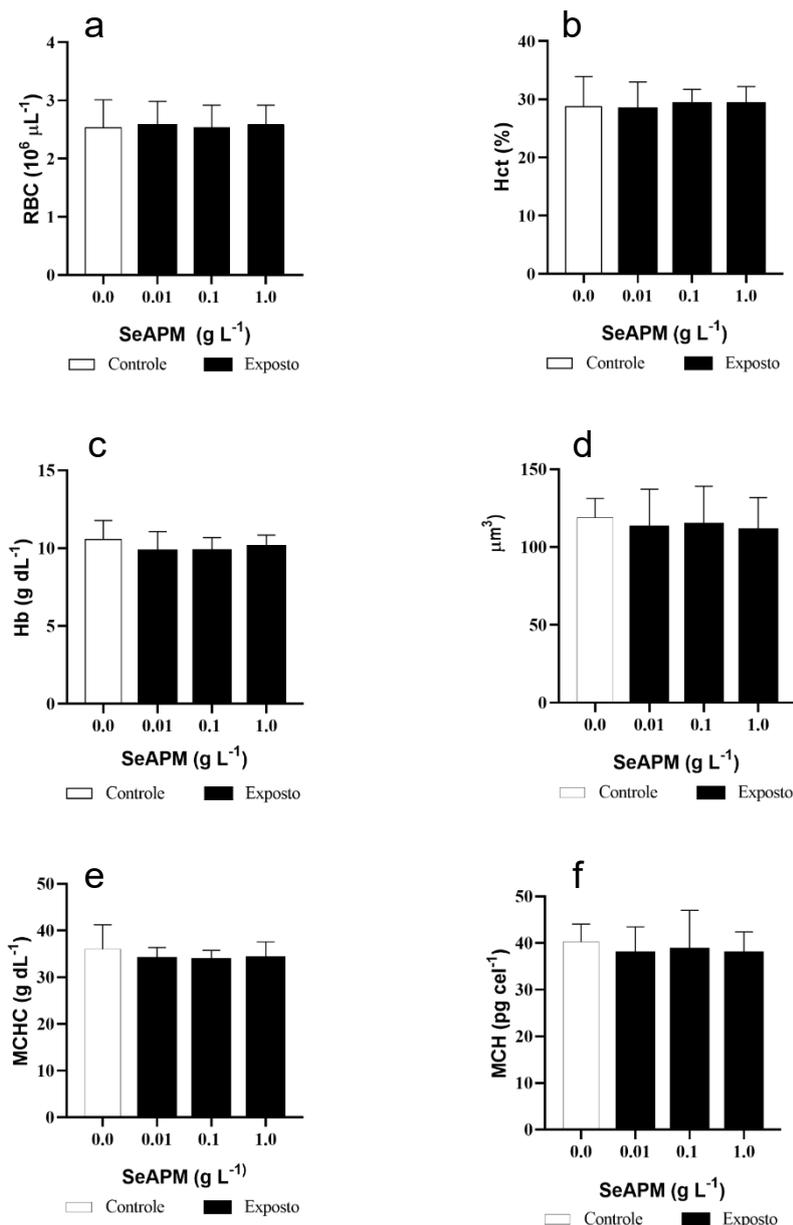


Figura 10. Número de eritrócitos (a), hematócrito (b), concentração de hemoglobina (c); Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (d), concentração de hemoglobina corpuscular média (e) hemoglobina corpuscular média (f) de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. Não houve diferenças significativas (Teste ANOVA One-Way e pós-teste de Dunnet)

### 8.2.2. Leucócitos (série branca)

No sangue de *O. niloticus* expostas ao diferentes concentrações de MPASe foram identificados eritrócitos, e os seguintes leucócitos: neutrófilos, monócitos e linfócitos (Figura 11).

Não houve diferenças para o número total de leucócitos entre o controle e as concentrações de MPASe (Figura. 12a). A contagem diferencial de leucócitos mostrou aumento de 27% nos linfócitos e diminuição de 78% nos monócitos nos animais expostos à concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> (Fig. 12b-d). Não houve diferença na contagem diferencial dos linfócitos no sangue dos animais expostos às concentrações de 0,01 e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe.

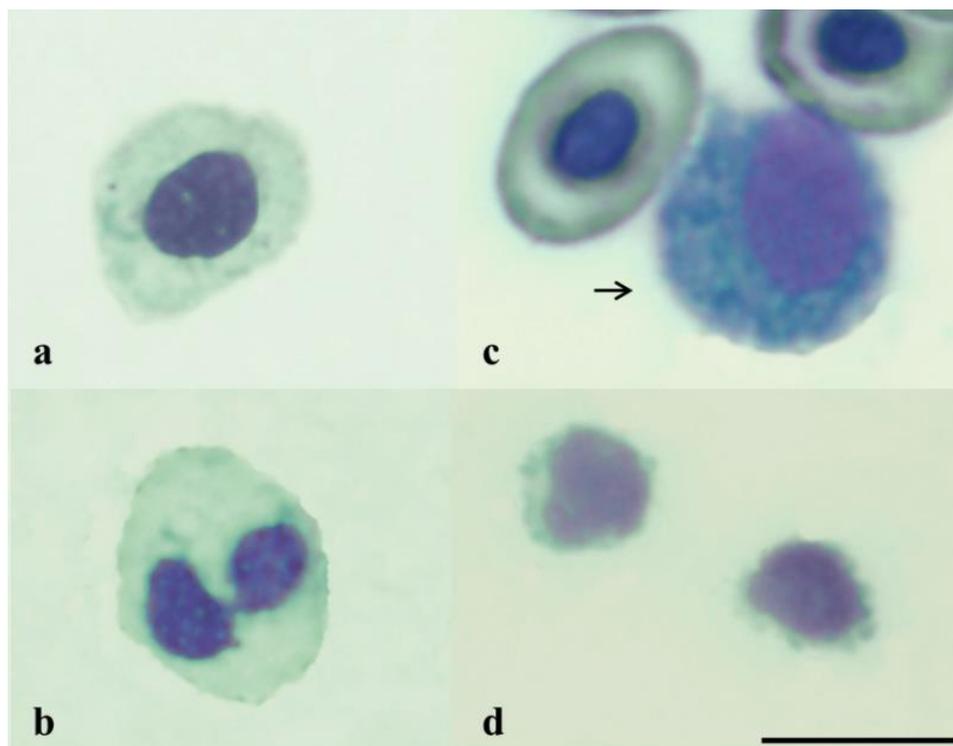


Figura 11. Leucócitos no sangue de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Neutrófilos (a e b), monócito (c) e linfócitos (d), Barra de escala = 10µm. Corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW).

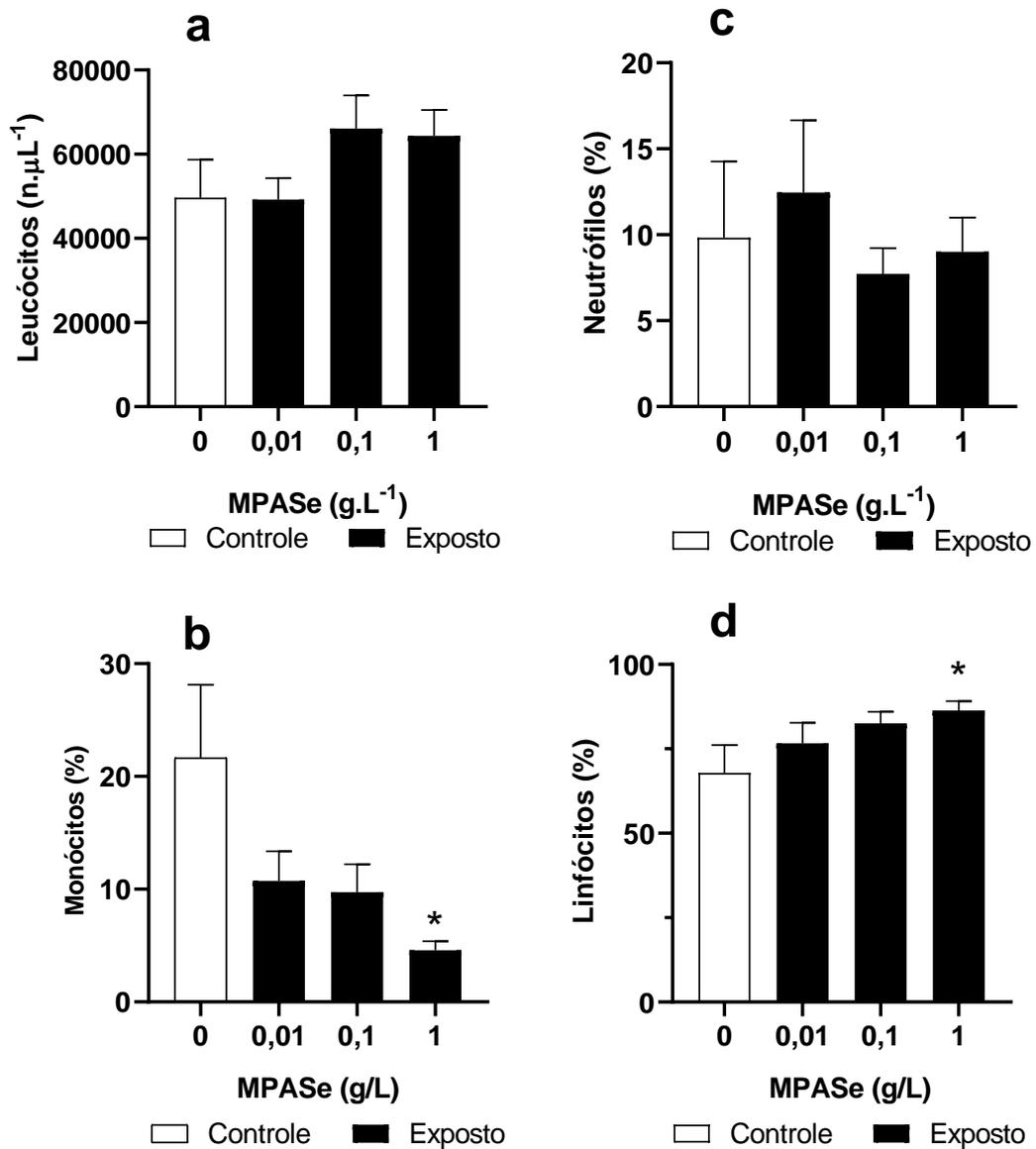


Figura 12. Número de leucócitos totais (a) e contagem diferencial de leucócitos (b, c e d) no sangue de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Monócitos (b), neutrófilos (c) e linfócitos (d). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. Grupo controle (0 g.L<sup>-1</sup> de MPASe), e grupos expostos à diferentes concentrações do MPASe. (n = 11). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão.\* Indica diferença significativa com p < 0,05 e leucócitos totais (teste ANOVA One-Way e pós-teste de Dunnett) em relação ao controle.

### 8.2.3. Trombócitos Totais

O número total de trombócitos (Figura 13) não apresentaram diferenças significativas entre o controle e as concentrações de MPASe (Figura 14).

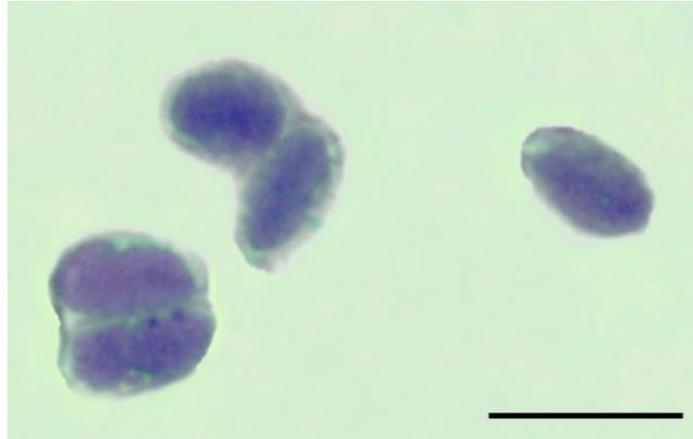


Figura 13. Trombócitos no sangue de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Barra de escala = 10 $\mu$ m. Corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW).

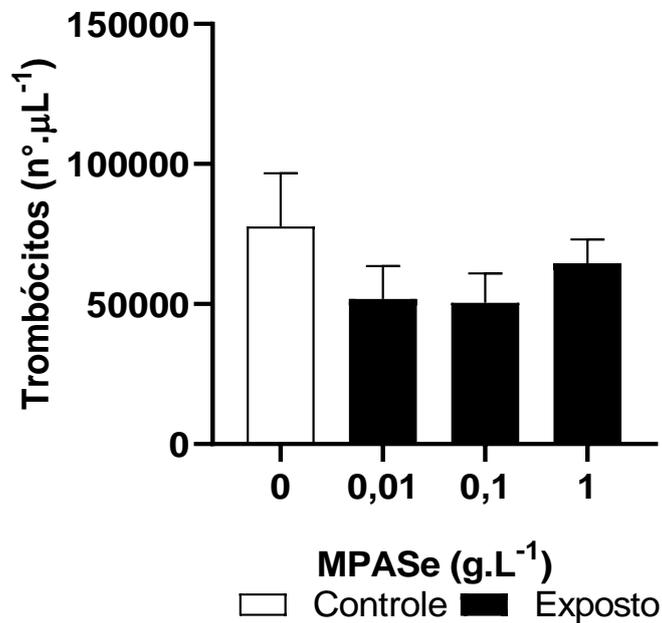


Figura 14. Número de trombócitos no sangue de *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe. Não houve diferenças para as concentrações analisadas. Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão (Teste ANOVA One-Way e pós-teste de Dunnett).

#### 8.2.4. Íons plasmáticos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>)

Após exposição ao MPASe não houve diferença nas concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> em relação ao grupo controle. Os íons cloreto diminuíram 9% nos animais expostos a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe (Figura 15).

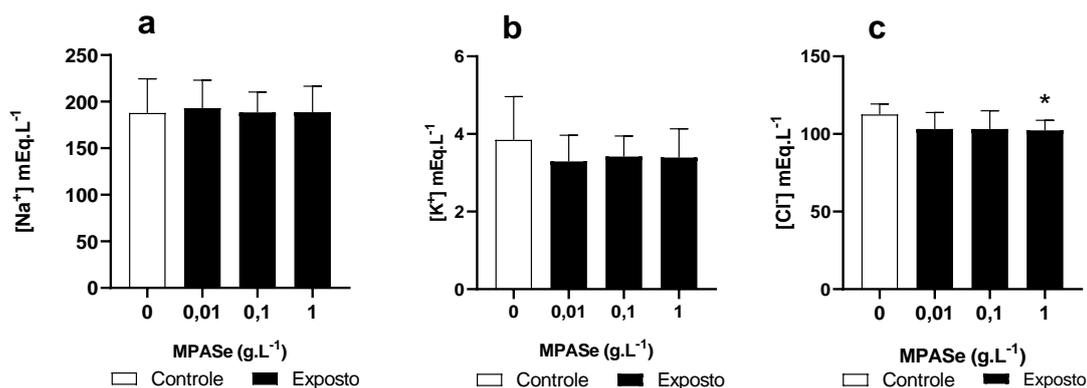


Figura 15. Concentração dos íons plasmáticos sódio (a), potássio (b) e cloro (c) em *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe e grupo controle (0 g.L<sup>-1</sup> MPASe). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. \* Indica diferença significativa para 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe com  $p = 0,0128$  (Teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) em relação ao respectivo controle ( $n = 11$ ).

#### 8.2.5. Eritroblastos e Alterações Nucleares Eritrocitárias

Análise do número de eritroblastos e eritrócitos (Figura 16) com alterações nucleares classificadas como forma de ferradura e apresentando brotos nucleares. Não foram encontrados micronúcleo. Não houve diferença significativa no número de eritroblastos e nas alterações nucleares entre o grupo controle e os expostos ao MPASe (Figura 17).

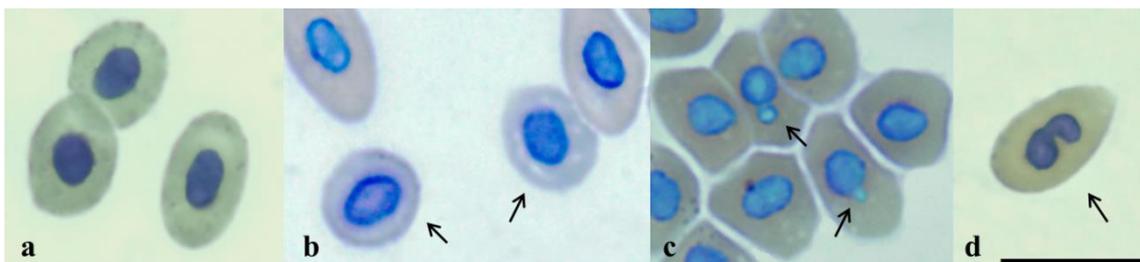


Figura 16. Série eritrocitária. Eritrócitos com núcleos normais (a), eritroblastos (b), com brotos nucleares (c) e núcleo em forma de ferradura (d). Escala 10  $\mu\text{m}$ . Corante: May-Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW).

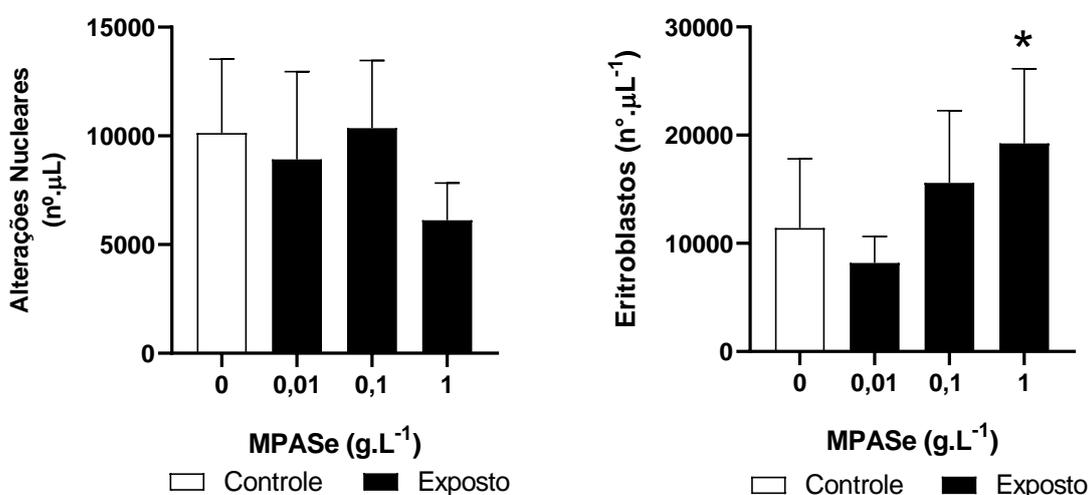


Figura 17. Alterações nucleares eritrocitárias (brotos e núcleos em forma de ferradura) e eritroblastos em *Oreochromis niloticus* após 96 horas de exposição à diferentes concentrações do MPASe e grupo controle (0 g.L<sup>-1</sup> MPASe). Não houve diferenças significativas para os tratamentos em relação ao controle ( $p > 0,05$ ) para as alterações eritrocitárias. \*Indica diferença significativa para eritroblastos na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> MPASe com  $p = 0,0431$  (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste de Dunnet) Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. ( $n = 11$ ).

### 8.2.6. Ensaio Cometa

A fragmentação do material genético pelo ensaio cometa classificada em scores (Figura 18) apresentou aumento significativo do score 4 (Figura 19a) e diminuição no score 2 (Figura 19b) nos nucleoides dos eritrócitos nos animais expostos a 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe. Para a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe o cometa apresentou dano moderado.

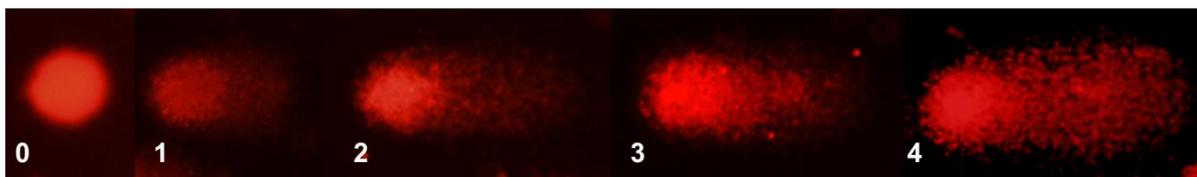


Figura 18. Ensaio cometa. Danos no DNA em nucleoides classificados em score 0: sem dano aparente; score 1: pouco dano; score 2: dano moderado; score 3: dano elevado e score 4: dano máximo.

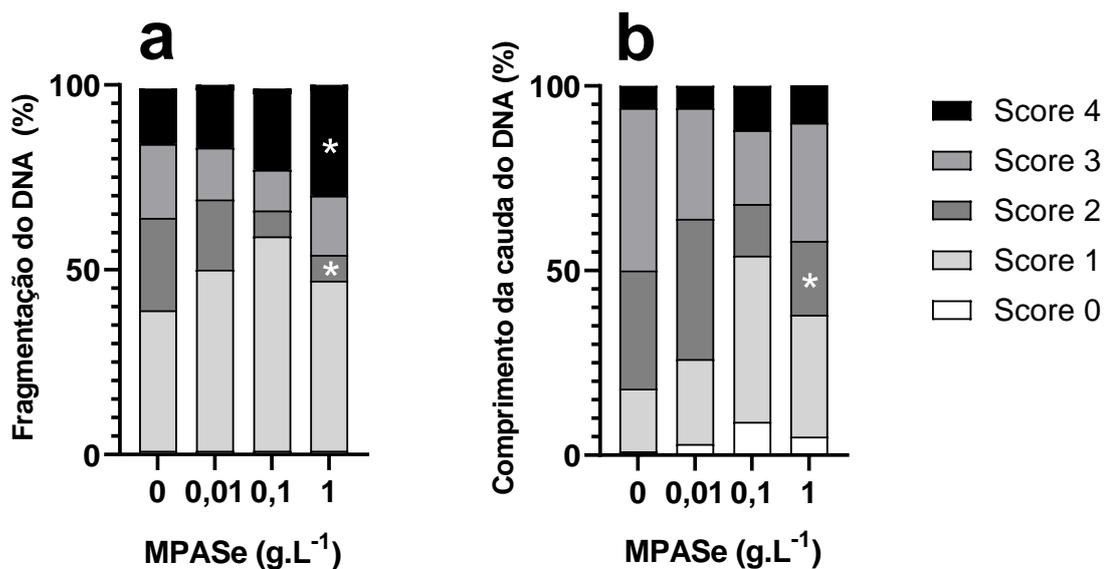


Figura 19. Percentual de danos em fragmentação (a) e comprimento (b) do DNA na cauda. Score 0 (sem dano aparente), score 1 (pouco dano), score 2 (dano moderado), score 3 (dano elevado) e score 4 (dano máximo). \*Indica diferença significativa na fragmentação do DNA para score 2 e 4 com  $p = 0,03$  e no comprimento da cauda para score 2 com  $p = 0,03$  (Teste de Kruskal-Wallis e Pós-teste de Dunn).

### 8.3. Atividades das enzimas relacionadas ao equilíbrio iônico

#### 8.3.1. Atividade das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e $\text{H}^+$ -ATPase nas brânquias

As atividades das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase (Figura 20), nas brânquias de *O. niloticus*, não apresentaram mudanças significativas durante o período de 96 horas.

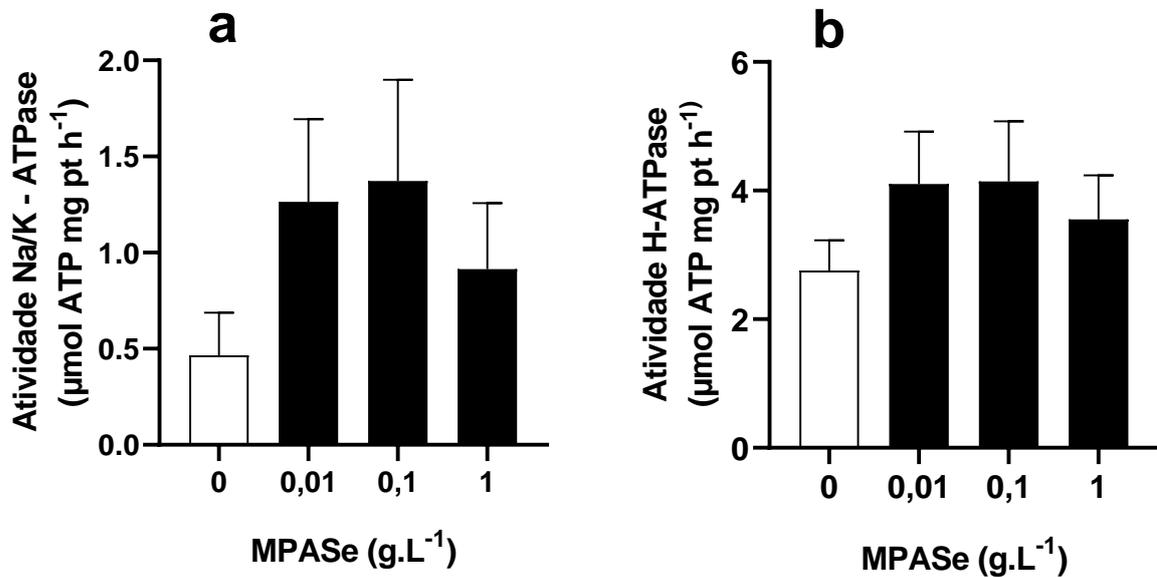


Figura 20. Atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (a) e  $\text{H}^+$ -ATPase (b) nas brânquias de *O. niloticus*. Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. ( $n = 11$ ). Não houve diferenças significativas (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

### 8.3.2. Atividade da Enzima Anidrase Carbônica (AC)

A atividade da enzima da AC nas brânquias de *O. niloticus* diminuiu 43% após exposição a concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe como consta na Figura 21.

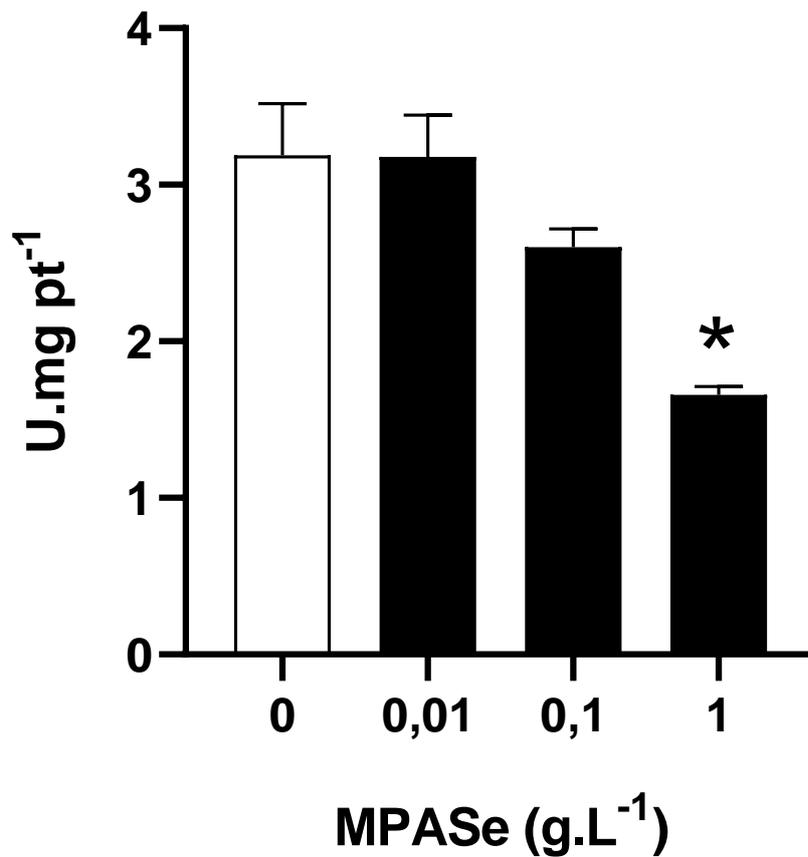


Figura 21. Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) nas brânquias. \* Indica diferença significativa para brânquias com  $p < 0,0001$  para 1g.L<sup>-1</sup> (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste Dunnett's) em relação ao respectivo controle. Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. (n = 11).

#### 8.4. Respostas antioxidantes e estresse oxidativo nas brânquias

A análise da enzima catalase nas brânquias apresentou aumento de 86% como consta na Figura 22 a diferença significativa para a concentração de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe.

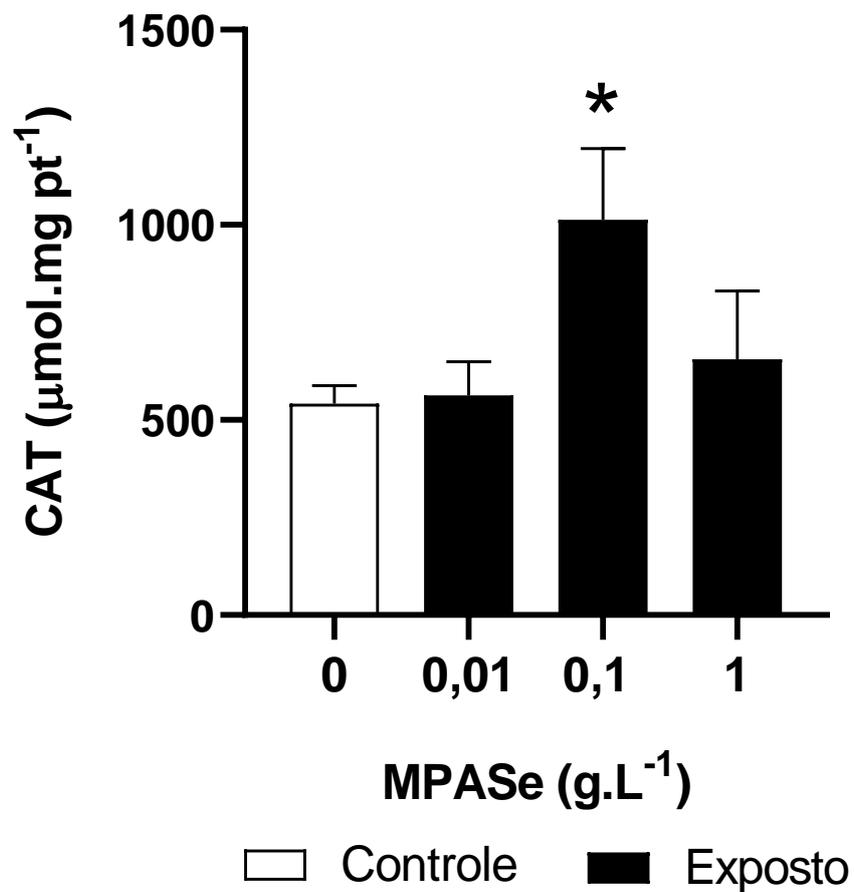


Figura 22. Atividade da enzima catalase em brânquias. \*Indica diferença significativa com  $p < 0,05$  em relação ao controle. Brânquias com  $p = 0,0341$  para 0,1 g.L<sup>-1</sup> (Teste Anova-OneWay; Pós-teste de Dunnett's). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. (n=11).

A atividade da enzima GST aumentou significativamente 36% nas brânquias como consta na Figura 23 para a concentração de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe.

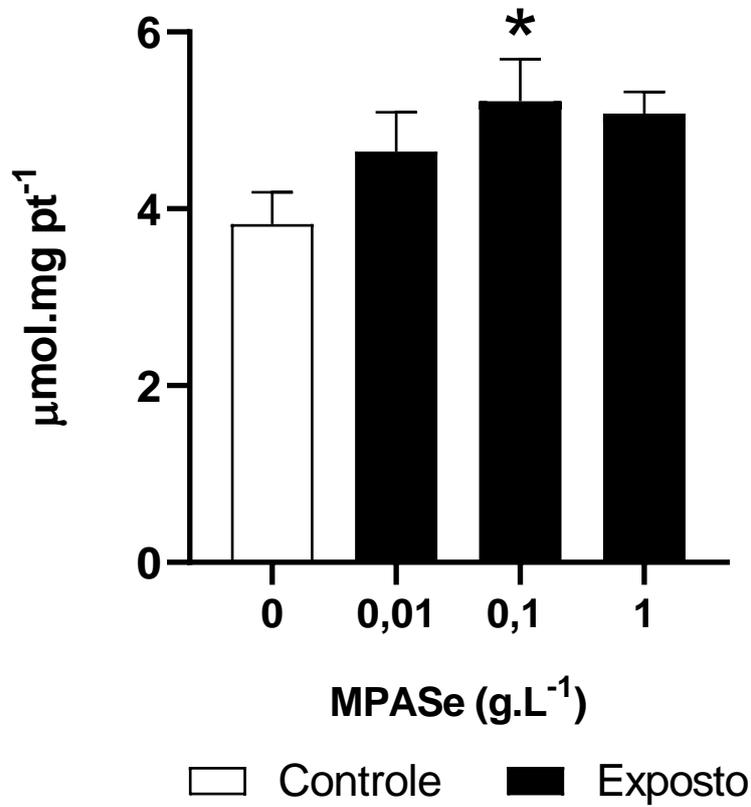


Figura 23. Atividade da enzima GST em brânquias. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. Brânquias com  $p = 0,0416$  para 0,1 g.L<sup>-1</sup> (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste de Dunnet's). Os valores correspondem às médias e seus respectivos erros-padrão. (n=11).

Os conteúdos de glutathiona reduzida estão expressos na Figura 24. Houve aumento de 11% para 0,01 g.L<sup>-1</sup>, 16% para 0,1 e 1 g.L<sup>-1</sup> na conjugação da glutathiona todos os grupos expostos ao MPASe.

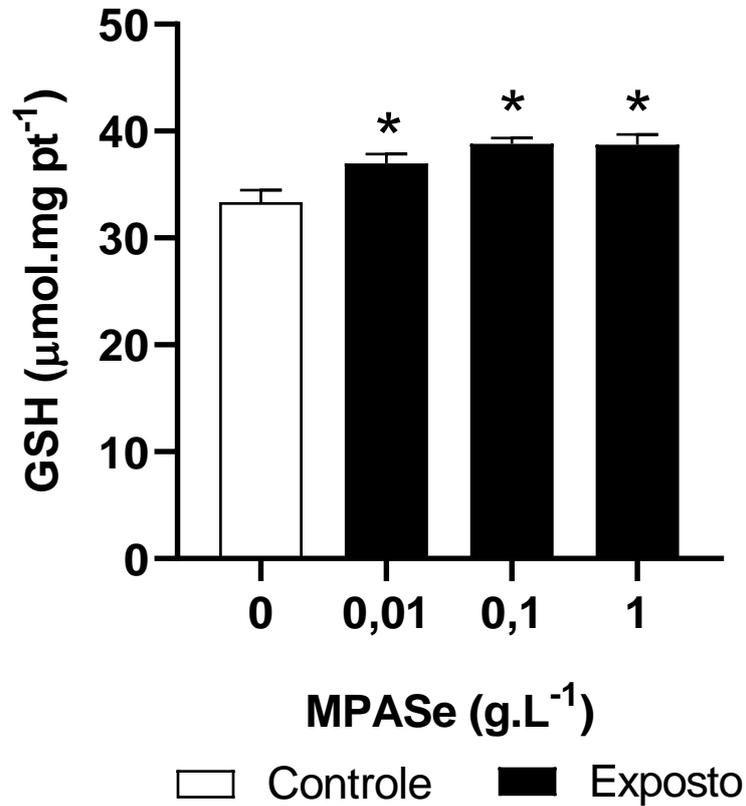


Figura 24. Conteúdo de glutathiona reduzida em brânquias após 96 horas de exposição ao MPASe. \* Indica diferenças significativas para as brânquias com  $p = 0,0206$  para 0,01 g.L<sup>-1</sup>;  $p = 0,004$  para 0,1 e 1 g.L<sup>-1</sup> (Teste ANOVA One-Way e Pós-teste de Dunnett). Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. (n = 11).

O conteúdo dos resíduos de sulfidril (-SH) na molécula de metalotioneína está representado pela Figura 25 onde se nota aumento de 138% e pela análise estatística constatou-se diferença significativa para a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPASe.

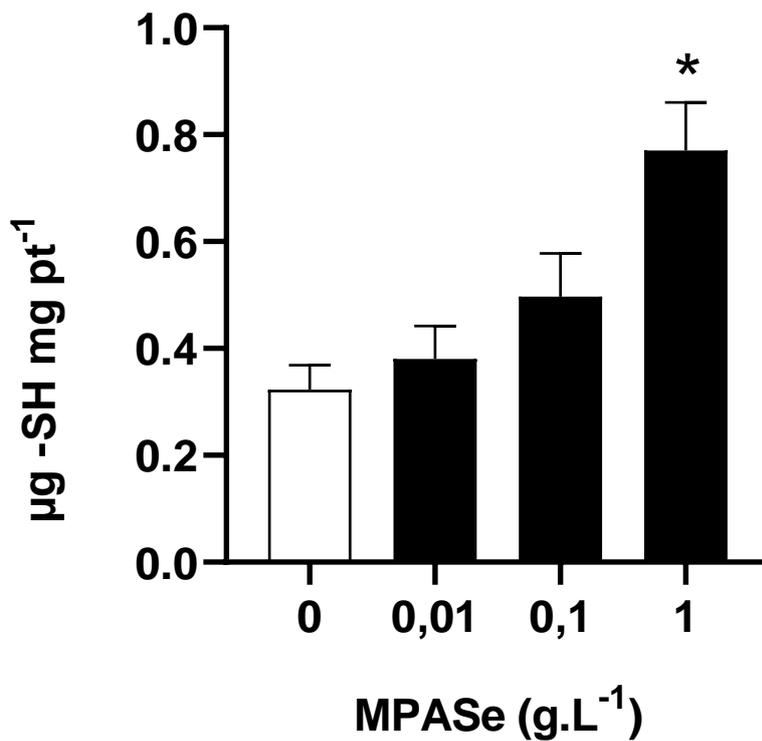


Figura 25. Conteúdos dos resíduos de (-SH) na metalotioneína nas brânquias de *O. niloticus* após 96 horas de exposição ao MPASe. \* Indica diferença significativa para 1g.L<sup>-1</sup> com p = 0,0002 (Teste Anova-OneWay e Pós-teste de Dunnett's) em relação ao respectivo controle. Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. (n = 11).

Níveis de peroxidação lipídica (Figura 26) em brânquias de *O. niloticus* expostos ao MPASe por 96 horas.

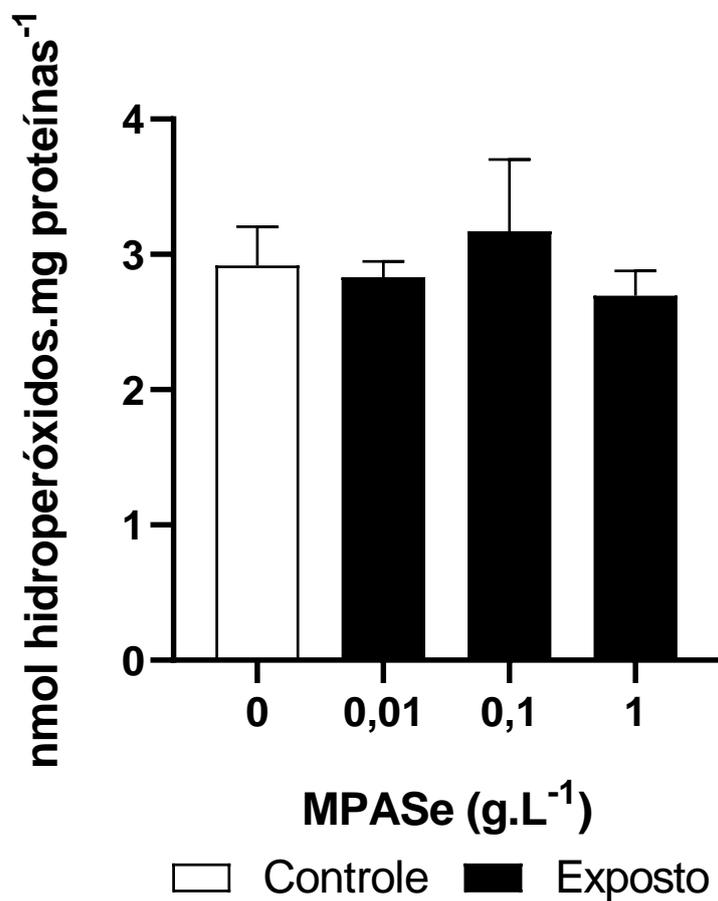


Figura 26. Níveis de peroxidação lipídica em brânquias. Não houve diferenças significativas para brânquias com  $p > 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn). Os valores correspondem às médias e seu respectivo erro-padrão. ( $n = 11$ ).

## 8.5. Histopatologias nas brânquias

O epitélio do filamento das brânquias dos peixes do grupo controle era constituído por várias camadas de células tipos de células e o das lamelas era constituído por duas camadas de células (Figura 27). A maioria das células da camada em contato com o meio aquático eram células pavimentosas e, entre elas estavam distribuídas células de cloreto (Figura 27), de mucosa e lamelas finas constituídas por duas camadas celulares. A maioria das células da camada em contato com o meio aquático são células de pavimento e algumas células de cloreto são encontradas entre elas, ambos os grupos de controle mostraram células de cloreto nas lamelas.

As histopatologias identificadas nas brânquias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos ao MPASe foram dilatação do canal marginal e basal, congestão e hiperplasia lamelar, alargamento do espaço intersticial no epitélio do filamento, hiperplasia do epitélio do filamento com fusão total ou parcial de lamelas, hipertrofia e proliferação de células cloreto e proliferação de células mucosas, e estão mostradas na Figura 28. Algumas alterações histopatológicas foram encontradas distribuídas aleatoriamente nas brânquias dos grupos controle, como hiperplasia do epitélio do filamento, hipertrofia das células pavimentosas do epitélio lamelar e os animais expostos a  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  de MPASe apresentaram principalmente hipertrofia das células pavimentosas do epitélio lamelar. Aneurismas na lamela e no canal marginal foram raros ( $< 10\%$ ) e ocorreram principalmente nos animais controle e expostos a  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  de MPASe. Em geral, as alterações ocorreram, em média, abaixo de  $10\%$  das amostras analisadas. Nos animais expostos a  $0,1$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$  de MPASe apresentaram maior frequência de histopatologias, incluindo maior frequência de hiperplasia do epitélio do filamento gerando fusão parcial de duas a cinco lamelas; hipertrofia das

células pavimentosas do epitélio lamelar, alargamento do espaço intersticial no epitélio do filamento. Hipertrofia de células cloreto ocorreu nos animais de todos os grupos. Células mucosas no epitélio do filamento entre as lamelas estavam presentes nos animais do grupo controle e mostraram tendência de aumento nos animais expostos a 0,1 e 1 g L<sup>-1</sup> de MPASe.

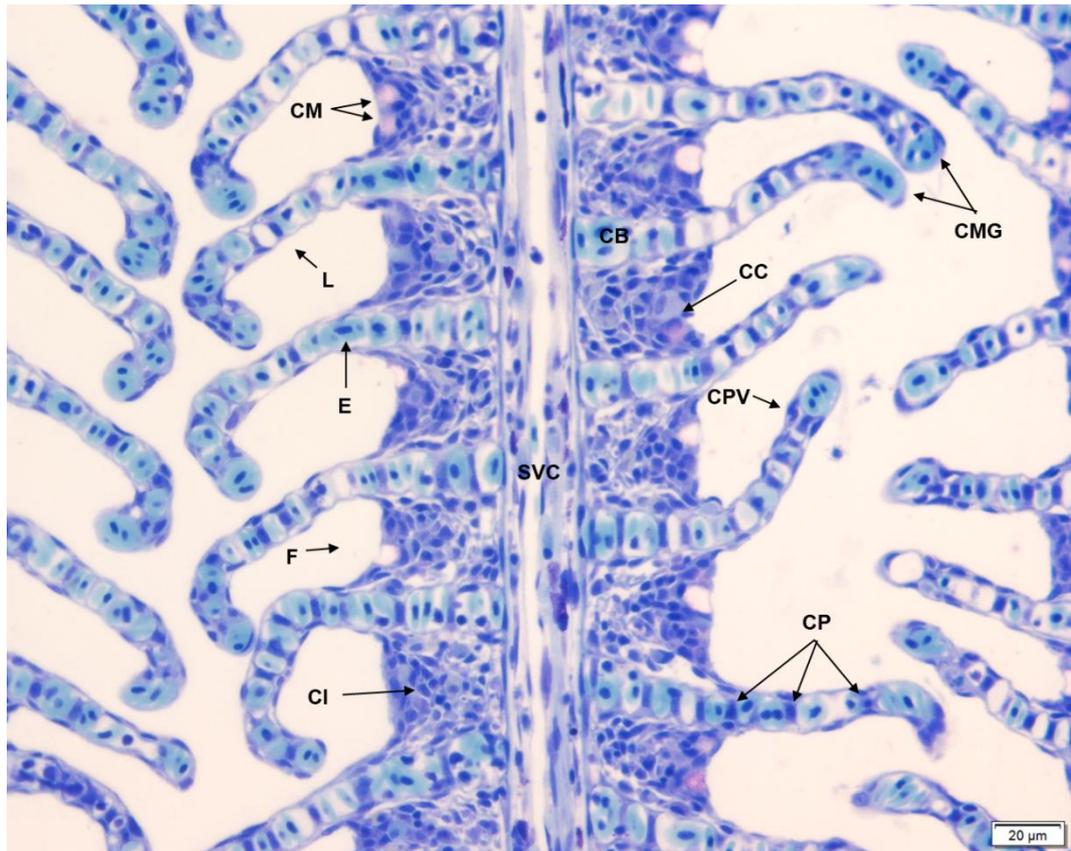


Figura 27: Filamento e lamelas branquiais de *O. niloticus*. L: lamela; F: filamento; CI: células indiferenciadas; CC: célula cloreto; CM: célula mucosas; CP: célula pilar; E: eritrócito; CMG: canal marginal; CB: canal basal; SVC: seio venoso central; CPV: célula pavimentosa. Corante: Azul de Toluidina. Escala 20 μm.

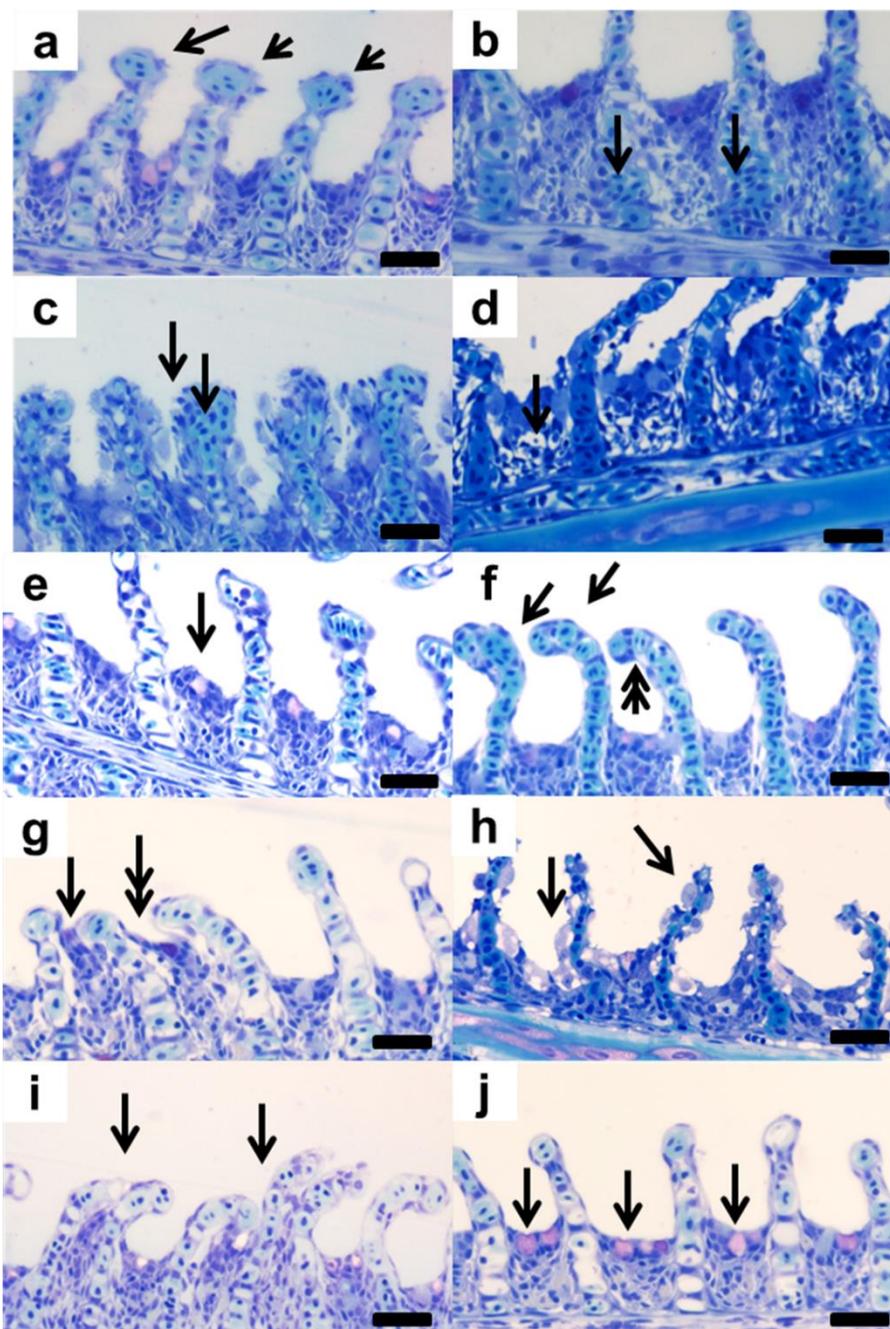


Figura 28. Alterações histopatológicas em brânquias de *O. niloticus* após 96 horas de exposição ao MPASe. (a) Dilatação do canal marginal (seta). (b) Dilatação do canal basal (seta). (c) Congestão e hiperplasia lamelar (seta). (d) Enlargamento do espaço intersticial no epitélio do filamento (seta). (e) Hiperplasia do epitélio do filamento (seta). (f) Hiperplasia (seta) e hipertrofia (seta dupla) do epitélio lamelar. (g) Fusão total lamelar (seta) e fusão parcial lamelar (seta dupla). (h) Proliferação de células cloreto (seta). (i) Fusão total lamelar (seta). (j) Proliferação de células mucosas (seta). Corante: Azul de Toluidina. Escala 20  $\mu$ m.

As alterações histológicas foram analisadas a partir de um score de lesões como descrito em Material e Métodos e para cada lesão foi considerado um fator de importância (Fi). Considerando o score e o Fi foi calculado o índice de lesões para as brânquias de acordo

com Bernet (1999) a qual não demonstrou alterações histológicas estatisticamente significantes para os órgão e período analisado (Figura 29).

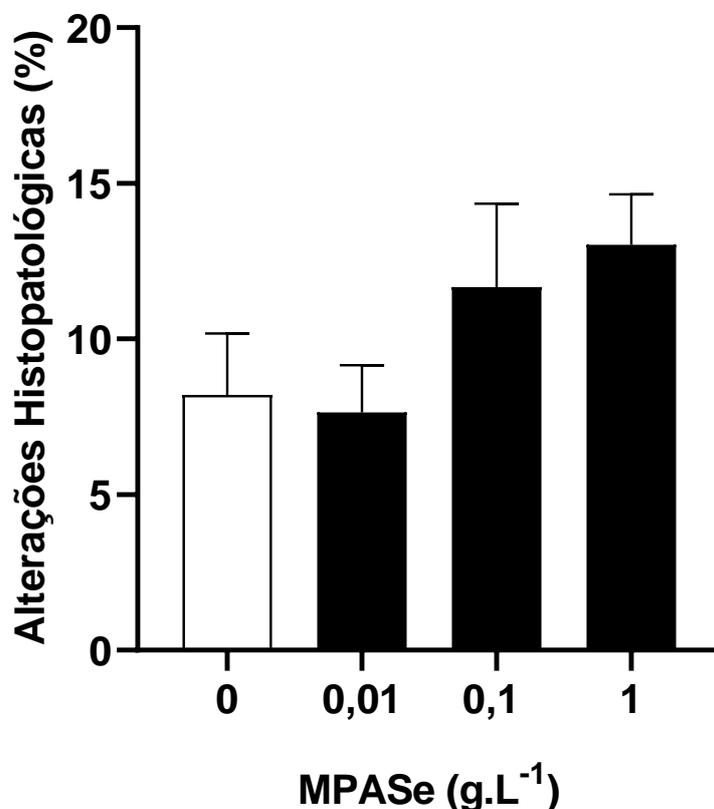


Figura 29. Índice de alterações histopatológicas em brânquias de *O. niloticus* analisados no grupo controle 0 g.L<sup>-1</sup> e nos grupos expostos os MPASe, durante 96 horas. Não houve diferenças significativas para brânquias com  $p > 0,05$  (teste Anova One-Way e pós-teste de Dunnett).

## 9. Discussão

Durante o experimento os animais do grupo controle e os animais expostos às concentrações de 0,01 e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe apresentaram comportamento que se aproximava à territorialidade o que levou a morte de um animal de cada grupo, totalizando três animais. Em estudos de Medeiros et al.(2007) e Chellappa et al. (2014) há relato de comportamento agonista e territorialista entre machos de híbridos de tilápias (*Oreochromis niloticus* e *Oreochromis mossambicus*) onde o comportamento por ele observado é mesmo daquele já relatado para a tilápia-do-Nilo.

A análise multielementar mostrou que o MPA é constituído por diferentes metais em diferentes concentrações como mostrado na Tabela 1 confirmando que o Ferro (Fe) e alumínio (Al) são os principais elementos como já reportados por Fortes (2020). Fe, Al e manganês (Mn) foram os principais constituintes do pó preto com concentrações acima de  $1000 \mu\text{g.g}^{-1}$ , seguido pelo zinco (Zn), cobre (Cu), titânio (Ti) e bário (Ba) com concentrações acima de  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ . Os demais elementos estão presentes em concentrações abaixo de  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ : chumbo (Pb), estrôncio (Sr), cromo (Cr), níquel (Ni), vanádio (V), cério (Ce), zircônio (Zr), lantânio (La), ítrio (Y), arsênio (As), molibdenio (Mo), rubídio (Rb), selênio (Se), nióbio (Nb), tungstênio (W), cádmio (Cd). Dos metais encontrados Ti (titânio), rubídio (Rb), estrôncio (Sr), ítrio (Y), zircônio (Zr), nióbio (Nb), estanho (Sn), lantânio (La), cério (Ce), tálio (Ta), tungstênio (W) e bismuto (Bi) são emergentes.

A constituição metálica do MPA emitido pelas indústrias metalúrgicas na região de Vitória, ES, já foi reportado por Arrivabene et al. (2015) e Souza et al (2021a) sendo o Fe, Al, os constituintes com maior concentração e outros metais em menores concentrações como: Mn, Zn, Sr, Cr, Ni, V, Cu, Pb, Rb e As (Arrivabene et al., 2015) e Mn, Bi, Zn, Y, La, Nb, Ba, Sn, Sr e Ce (Souza et al, 2021a).

Recentemente, Souza et al. (2021a), estudando a composição, estabilidade, tamanho e dispersão do MPA, mostrou que o MPA, independente do tamanho, se dissocia em meio aquoso em nanopartículas (NP) menores que 200 nm e em metais livres. No presente estudo, considerando que parte do MPASe depositada no fundo do aquário possivelmente não estava biodisponível, a absorção dos metais via brânquias, durante o processo respiratório pode ter sido relativamente baixa.

O ferro é um dos metais mais abundantes da Terra e é essencial para quase todos os organismos devido a atividade redox do ferro, pois permite que ele seja um componente integral da respiração celular e por seu posicionamento na hemoglobina que aumenta a capacidade de transporte de oxigênio do sangue. No entanto, o ferro em excesso pode ser tóxico. No nível celular, o ferro catalisa a reação de Fenton, resultando na geração de espécies de radicais livres, incluindo radicais hidroxila, que podem potencialmente causar danos oxidativos celulares (Bury e Grosell, 2003).

As alterações na concentração de amônia e na condutividade medidas durante os experimentos foram também comparados a Resolução Conama 357/2005. De acordo com Randall e Tsui (1999) peixes sob estressores ambientais podem estar

mais sensíveis à toxicidade da amônia disponível no ambiente e em níveis altos podem devido à poluição ou a excreção dos peixes quando em altas densidades a amônia ambiental pode aumentar a amônia corporal provocando convulsões e mortes mas algumas espécies são tolerantes a amônia. A Resolução Conama 357/2005 dispõe sobre os limites para amônia total para  $3,7 \text{ mg.L}^{-1}$  em corpos de água doce. A amônia total do presente estudo apresentou  $3,29 \text{ mg.L}^{-1}$  para a concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  do MPASe, valor abaixo do nível estabelecido pela Resolução. Seu aumento pode estar relacionado à quantidade do contaminante no aquário experimental e sua influência como agente estressor nos animais, pois as densidades dos animais foram mantidas em todos os experimentos.

Segundo Esteves (2011) a condutividade é a capacidade de uma solução em conduzir corrente elétrica em função da quantidade de íons presentes na água, portanto quanto maior a quantidade de íons maior será a condutividade a qual também pode estar relacionada às características geoquímicas de regiões tropicais. No atual experimento a condutividade apresentou  $66,37 \mu\text{S.cm}^{-1}$  para a concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  MPASe, sendo assim o aquário que recebeu maior quantidade de MPASe, teve maior quantidade de material particulado dissolvido na água aumentando a condutividade elétrica em relação ao controle.

Embora a exposição de *O. niloticus* às concentrações ambientalmente relevantes, durante 96 h, não foi letal para a espécie, a exposição às concentrações mais altas ( $0,1$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) induziu alterações nos tipos de leucócitos e apresentou genotoxicidade. Alterações nos parâmetros sanguíneos são esperados em animais expostos a metais, uma vez que, dissolvidos no meio aquático são absorvidos e, transportados pelo sangue, podendo se acumular nas vísceras e músculo (Fortes, 2021).

Os valores hematológicos podem variar dependendo do meio em que o animal se encontra, sazonalidade e das condições nutricionais. Temperatura,  $\text{O}_2$  dissolvido, pH, contaminantes na água são fatores físicos e químicos que influenciam os parâmetros hematológicos, assim como estresse e parasitismo (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Os valores de Hct, RBC, VCM do grupo controle, neste estudo, estão próximos aos encontrados para a espécie, com exceção da concentração de Hb que foi mais alta do que tem sido descrito para a espécie (Ueda et al., 1997).

Considerando que a função do sangue é transportar oxigênio e nutrientes para os tecidos e metabólitos resultantes do metabolismo celular para os órgãos de excreção para serem eliminados do organismo, a não alteração dos parâmetros hematológicos como RBC, Hct e [Hb] assim como os índices hematimétricos evidenciaram que os metais presentes no MPASe, dissolvidos na água e absorvidos não interferiram na capacidade do transporte de O<sub>2</sub> do sangue, embora os eritrócitos estejam em contanto direto com os metais transportados. Alterações nos parâmetros hematológicos evidenciando ajustes para manter a capacidade de transporte de O<sub>2</sub> foram demonstrados pelo aumento do RBC, Hct e [Hb] em *Prochilodus lineatus* expostos a 29 µg cobre L<sup>-1</sup> (Cerqueira e Fernandes, 2002). Entretanto, metais podem afetar os eritrócitos e induzir a redução dos parâmetros hematológicos como descrito em *O. niloticus* expostas a 1/10 e 1/20 da CL<sub>50</sub>/96 h de óxido de cobre e a nanopartículas de óxido de cobre por 30 dias (Abdel-Khalek et al., 2016) e *Pangasianodon hypophthalmus* exposto a 0,8, 1,6, e 3,2 mg L<sup>-1</sup> cádmio por 30 dias (Suchana et al., 2020) evidenciando possível redução no transporte de O<sub>2</sub> e conseqüentemente, no metabolismo aeróbico. Soares et al. (2022), avaliando o efeito do SeAPM, coletado na mesma região em *O. niloticus* adultas verificou que houve redução no Hct, RBC e concentração de Hb. O que sugere maior sensibilidade de animais maiores aos metais e outros componentes do SeMPA.

O sangue normalmente contém certa porcentagem de eritroblastos ou eritrócitos imaturos também denominados pró-eritrócitos ou reticulócitos. Eritroblastos podem aparecer em maior quantidade no sangue caso haja uma maior produção deles como renovação no sangue de eritrócitos envelhecidos ou degradados pela presença de um contaminante. O rim anterior apresenta atividade eritropoiética maior que o baço e ambos atuam principalmente na renovação de eritrócitos para circulação sanguínea em caso de aumento de demanda de oxigênio (Witeska, 2013). A porcentagem de eritroblastos no sangue periférico pode também aumentar, em condições de hipóxia ambiental ou interna devido a agente estressor como o são os metais. Em *Cyprinus carpio*, o chumbo induziu aumento de eritroblastos após 3 h de exposição ao chumbo (10 mg L<sup>-1</sup>), cobre (5 mg L<sup>-1</sup>), cádmio (10 mg L<sup>-1</sup>), e zinco (20 mg L<sup>-1</sup>) (Witeska, 2005). O período de exposição ao MPASe pode não ter sido suficiente para causar respostas significativas nos grupos expostos a 0,1 e 1 g.L<sup>-1</sup>.

Os efeitos genotóxicos e mutagênicos podem estar correlacionados com a presença de metais na água (Ergene et al., 2007) ou outros contaminantes. As

alterações resultantes no DNA após exposição aos metais presentes no meio aquático após contaminação com o MPASe, evidenciaram que na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe, pelo ensaio cometa, nos eritrócitos de *O. niloticus*, esses metais são genotóxicos. A exposição de *Prochilodus lineatus* ao Fe (1,7 mg.L<sup>-1</sup>) induziu genotoxicidade nos eritrócitos entretanto, após exposição combinada Fe+Zn+Mn no qual o nível de Fe foi 0,8 mg.L<sup>-1</sup> não houve alterações no DNA (Oliveira et al., 2018). As alterações observadas pelo ensaio cometa indicam instabilidade no DNA dos eritrócitos e podem estar relacionados com alterações nucleares (Bonomo et al., 2021). Metais como cromo, chumbo e cobre foram estudados em *Ctenopharyngodon idella* expostos a concentrações igual a CL50 e causaram alterações nucleares eritrocitárias e micronúcleo. Estas alterações foram evidenciadas principalmente pela exposição ao cromo, moderadamente ao chumbo e pouco ao cobre (Shah et al., 2021). Após exposição de *O. niloticus* ao MPASe, as alterações nucleares eritrocitárias como a formação de brotos e núcleos em forma de ferradura evidenciaram que, embora o MPASe tenha altas concentrações de alguns metais como Fe, Zn, Pb, Mn e, genotoxicidade tenha sido demonstrada por esses metais em outros estudos com diferentes espécies de peixes, as concentrações presentes na água experimental após a adição do MPASe e absorvidas pelos peixes não apresentaram efeitos potencialmente mutagênicos.

Os leucócitos são constituídos por granulócitos (basófilos, neutrófilos e eosinófilos) e agranulócitos (monócitos e linfócitos) e formam a principal defesa contra agente infecciosos e xenobióticos. Para *O. niloticus*, no presente estudo, não houveram alterações no número de leucócitos totais como descrito para *Labeo rohita* após exposição ao ferro por 96 horas (Singh et al., 2019).

Em *Cyprinus carpio*, chumbo, cobre, cádmio e zinco causaram diminuição de linfócitos e aumento de neutrófilos após 96 horas de exposição (Witeska, 2005). Os monócitos atuam na preservação dos tecidos (macrófagos) e, então, sua presença no sangue pode ser diminuída pela migração tecidual (Campbell, 2015; Hodgkinson et al., 2015). O aumento de linfócitos pode ser uma resposta à presença de metais no MPASe e a diminuição de monócitos, no presente estudo, pode ser atribuída ao estímulo do sistema imune relacionado aos danos teciduais causados por metais como em *Garra gotyla gotyla* (Sharma e Langer, 2014).

A função dos trombócitos nos peixes é similar à função das plaquetas nos mamíferos para o processo de coagulação sanguínea na contenção da hemorragia em resposta à injúria nos tecidos (Tavares-Dias et al., 2004; Campbell, 2015; Grant, 2015). Metais como o cromo em *Tilapia sparmanii* (van Pittius et al. 1992; Nussey et al. 1995) e o cobre em *Oreochromis mossambicus* (Nussey et al., 1995c) podem alterar o tempo de coagulação. No entanto, para *Prochilodus scrofa*, os trombócitos não sofreram alterações funcionais ou de produção após exposição ao cobre (Mazon et al., 2002). Neste estudo, a concentração de cobre e cromo presentes no MPASe não foram prejudiciais à produção de trombócitos.

Em relação a ionoregulação, o equilíbrio de sódio e potássio não apresentou alteração significativa, pois normalmente os metais divalentes como chumbo, cádmio ou zinco são vistos como antagonistas de cálcio incluindo íons monovalentes devido a perda de cloro no plasma de *Oncorhynchus mykiss* (Rogers et al., 2003)., durante exposição ao MPASe o chumbo parece incluir íons monovalentes na exposição ao MPASe. O cobre e o chumbo podem afetar a homeostase de sódio/cloreto por interferência na captação ativa de sódio da água pelos canais apicais de sódio e o chumbo pode competir pelo sitio de ligação do sódio e cloro interrompendo a regulação destes íons e iniciar o efeito tóxico em *Oncorhynchus mykiss* (Rogers et al., 2005). Nos peixes de água doce, o aumento na perfusão das lamelas secundárias das brânquias favorece a tomada de oxigênio e é acompanhado por aumento na permeabilidade das membranas o que aumenta o ganho de água do meio externo ao animal e a consequente perda de íons  $\text{Cl}^-$  para o ambiente (Moron et al., 2006).

O impacto dos metais no organismo dos peixes pode interferir na regulação iônica (Shaw e Handy, 2011; Ribeiro et al., 2014). As atividades das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase nas brânquias de *O. niloticus*, não apresentaram mudanças significativas durante o período de 96 horas, porém a atividade da enzima AC nas brânquias de *O. niloticus* diminuiu 43% após exposição a concentração de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe. De acordo com Wood et al. (2015) a presença de metais pode inibir a atividade da anidrase carbônica intracelular nos ionócitos; esta enzima hidrata o  $\text{CO}_2$  de modo a produzir os íons  $\text{H}^+$  que normalmente são trocados por  $\text{Na}^+$  e os íons  $\text{HCO}_3^-$  que normalmente são trocados por  $\text{Cl}^-$  na membrana apical. Como resultado,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  diminuem a concentração no plasma sanguíneo como ocorreu na análise de íons plasmáticos, no entanto o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{K}^+$  plasmáticos não apresentaram diferenças

significativas ao contrário da concentração do íon  $\text{Cl}^-$  que diminuiu levemente no plasma.

Metais podem induzir estresse oxidativo por superprodução de espécies reativas de oxigênio ou inibindo as defesas antioxidantes (Carvalho et al, 2015). Como nos demais órgãos, as células das brânquias possuem sistema antioxidante enzimático e não enzimático de forma a proteger as células contra as espécies reativas de oxigênio que possam ser geradas pela presença de metais no órgão. Dentre elas, a catalase é uma das primeiras linhas de defesa enzimática de fase II do processo de desintoxicação (Ighodaro e Akinloye, 2018), responsável por decompor o peróxido de hidrogênio em hidroxilas e água. Estudos realizados com *O. niloticus* coletadas no correjo Monjolinho, em São Carlos, SP, contaminado com metais Cu, Zn, Mn e Fe com níveis acima do recomendado pela resolução Conama 357/2005 mostrou que a atividade da CAT diminuiu nos meses com os mais altos níveis desses metais presentes na água (Carvalho et al., 2012). Em estudo realizado por Firat e Bozat (2018), a atividade catalase nas brânquias de *O. niloticus* diminuiu em 4 dias e aumentou em 14 dias de exposição de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$   $\text{TiO}_2$ -NPs. Entretanto, após exposição ao MPASe, a análise da enzima catalase nas brânquias apresentou aumento de 86% para a concentração de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe mas não para a concentração  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe, sugerindo que a resposta dessa enzima pode estar relacionada a concentração de metais na água.

A enzima de biotransformação de fase II, GST, desempenha um papel importante nos processos de desintoxicação e sua atividade mostrou um aumento em sua concentração após a exposição de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{TiO}_2$ -NPs no estudo de Firat e Bozat (2018) onde o autor mostra respostas variadas para sistemas enzimáticos e não-enzimáticos em *O. niloticus* expostos a diversas concentrações de  $\text{TiO}_2$ -NPs por períodos de 4 a 14 dias. Nesta pesquisa, a atividade de GST indicou um aumento significativo na exposição de peixes a  $\text{TiO}_2$ -NPs. Esta indução da atividade GST pode apresentar uma resposta adaptativa rápida para neutralizar os efeitos tóxicos das nanopartículas. A atividade da GST também aumentou nos meses com os mais altos níveis Cu, Zn, Mn e Fe presentes na água do córrego Monjolinho (Carvalho et al., 2012). A atividade da enzima GST, no presente estudo, demonstrou aumento 36% nas brânquias para a concentração de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de MPASe.

Os conteúdos de GSH apresentaram aumento de 11% no grupo exposto a 0,01 g.L<sup>-1</sup> e 16% nos grupos 0,1 e 1 g.L<sup>-1</sup> de MPASe. A conjugação da glutathiona reduzida (GSH) que é catalisada pela GST é uma rota muito importante de desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos como metais e pesticidas (Huber et al. 2008). Os níveis de GSH nas brânquias de *O. niloticus* após 14 dias de exposição a 10 µM de Cu em *O. niloticus* não houveram diferenças significantes após exposição ao cobre (Atli e Canli, 2008). No estudo de Firat e Bozat (2018) não houve alteração importante no conteúdo de GSH após a exposição dos peixes a 1,0 mg .L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>-NPs por 4 dias, enquanto uma elevação significativa foi encontrada em sua atividade na exposição de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>-NPs após 4 (47%) e 14 dias (93%).

Metalotioneínas conhecidas por serem expressas em organismos encontrados em ambientes com altas concentrações de metais como já relatado por Hamza-Chaffai e Amiard-Triquet (1997) e Oliveira et al. (2010) e tem função função associada à proteção celular contra a toxicidade de metais e também é um mecanismo de defesa celular contra radicais livres. O metabolismo dos metais envolve a formação de complexo GSH- metal a partir da qual o metal é transferido posteriormente para apoproteínas de MT (Atli et al., 2006). O conteúdo dos resíduos de sulfidrila (-SH) na molécula de metalotioneína apresentaram aumento de 138% para a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPASe. Nos estudos com *O. niloticus*, no córrego Monjolinho, as concentrações de MT foram mais altas nos meses com as mais altas concentrações de metais na água (Carvalho et al., 2012). No estudo de Atli e Canli (2008) não foi encontrado diferenças significativas para os níveis de MT nas brânquias.

A peroxidação lipídica é complexa, mediada por radicais livres, ocorre por uma cadeia autopropagada, e é um processo que desestabiliza as membranas biológicas (Wey and Yang, 2015). De acordo com o estudo de Singh et al. (2019), a peroxidação lipídica apresentou altou níveis causado por concentrações de 33 mg.L<sup>-1</sup> de ferro nas brânquias de *Labeo rohita* exposto por 96 horas e gerou de estresse oxidativo. No presente estudo, as brânquias de *O. niloticus* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

As respostas antioxidantes nas brânquias de *O. niloticus* expostas a diferentes concentrações de MPASe, por 96 h, parece ter evitado a lipoperoxidação lipídica nos tecidos desses órgãos. Entretanto, a exposição ao MPASe causou alterações no

epitélio branquial que sugerem respostas que reduzem a entrada de metais no organismo, via processo respiratório, como hiperplasia de células pavimentosas do epitélio do filamento e lamelar, e respostas compensatórias para manutenção do equilíbrio iônico como a hipertrofia e proliferação de células cloreto.

De acordo com McDonald e Wood (1993), uma das primeiras linhas de defesa contra a exposição a metais é a secreção de muco pelas brânquias e outra função comumente atribuída à secreção mucosa é retardar a perda eletrolítica das brânquias para o plasma. Os resultados do presente estudo nas análises histopatológicas em brânquias demonstraram que houve uma maior proliferação de células mucosas nos grupos expostos às concentrações de 0,1 e 1 g.L<sup>-1</sup> do MPASe. Este resultado sugere que as concentrações dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e, conseqüentemente pode ter se mantida estável no plasma.

Pela análise multielementar do MPASe e metais dissolvidos em água quando 1 g L<sup>-1</sup> de MPASe é adicionado a água no estudo de Fortes (2021), o ferro e o alumínio são os elementos em maior concentração. O mecanismo de absorção do Al é descrito por McDonald e Wood (1993) e mostra que o alumínio pode ser sequestrado ao se condensar em partículas elétron-densas, ser absorvido nas superfícies apicais das brânquias e posteriormente isolados pelos lisossomas por um processo de endocitose. Após o isolamento do metal, ele pode ser expelido por exocitose.

Segundo Wilson (2011), o alumínio não tem função biológica estabelecida, mas pode ser extremamente tóxico para peixes quando solubilizado em condições ácidas (pH = 6) ou alcalinas (pH = 8). Neste estudo, o pH do aquários se manteve com pH entre 7,32 e 7,75, fato este que pode ter facilitado a baixa toxicidade do alumínio. As alterações nos parâmetros morfométricos branquiais relevantes para a troca gasosa branquial na truta arco-íris após 5 e 34 dias de exposição subletal ao alumínio (30 mg.L<sup>-1</sup>) a pH 5,2 foram: a altura lamelar ainda estava reduzida e o epitélio filamento mais espesso, a área de superfície lamelar aparente foi reduzida em 22%.

Danzell e MacFarlane (1999), estudaram os efeitos do sulfato de Ferro (II e III) em brânquias de *Salmo trutta* expostos a concentrações letais: máxima de 42 mg.L<sup>-1</sup> e mínima de 12 mg.L<sup>-1</sup>, por 96 horas, e também a concentrações subletais: máxima de 12 mg.L<sup>-1</sup> e mínima de 6 mg.L<sup>-1</sup>, por 14 dias. Nesse estudo, as brânquias apresentaram danos generalizados, tais como: levantamento/descolamento epitelial com formação de espaços subepiteliais, hipertrofia ou necrose de células epiteliais,

ruptura e fusão lamelar. Também foi observado que o ferro não possuía tendência a se acumular na superfície do epitélio branquial o que justifica a baixa toxicidade do metal. No presente estudo, a análise morfológica das brânquias de *O. niloticus* expostas a concentrações de Fe de 404  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 387  $\mu\text{g.L}^{-1}$  dissolvidos em água após adição de 1 g  $\text{L}^{-1}$  de MPASe, também não demonstraram alterações significativas.

Sayadi, et al. (2020) analisaram a toxicidade aguda de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs e sais de ferro no peixe *Capoeta fusca* em 24, 48, 72 e 96 h e crônica por 28 dias. Neste estudo, as brânquias dos peixes nos outros grupos de tratamento mostraram algumas alterações significativas devido às exposições a concentrações de 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs, incluindo aneurisma, hiperplasia, edema, fusão de lamelas e necrose. A frequência de fusão das lamelas secundárias e anormalidades de hiperplasia epitelial foi mais alta nos peixes tratados com NPs  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em comparação com peixes tratados com os outros sais. Estudo mostra que o ferro complexado com outros elementos pode ter sua toxicidade diminuída.

Embora o metabolismo aeróbico, em repouso, possa não ser afetado, ou pelo menos restaurado com o tempo, a persistência dessas anormalidades estruturais nas brânquias sugere que a capacidade do sistema respiratório de troca gasosa pode permanecer comprometido durante a exposição aos metais. Alterações na capacidade do animal só se tornarão aparentes durante o aumento da demanda no metabolismo aeróbico, como atividade sustentada de natação ou recuperação de exercícios exaustivos / anaeróbicos.

## 10. Conclusão

Apesar das altas concentrações de Fe, Al, Mn, Zn, Cu, Ti e outros metais-traço no MPASe as respostas hematológicas dos eritrócitos se mantiveram constantes embora houvesse indicação de instabilidade no DNA dos eritrócitos. Dentre as respostas hematológicas o sistema de defesa leucocitário apresentou aumento na produção de células de defesa indicando início do processo de desintoxicação dos peixes com a presença dos metais na água.

A regulação iônica foi afetada pela exposição ao MPASe. Embora *O. niloticus* manteve os níveis dos íons plasmáticos sódio e potássio e a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ , houve redução na concentração de cloreto e diminuição da atividade

da enzima anidrase carbônica. Alterações bioquímicas e morfológicas podem ter contribuído para o desequilíbrio do íon cloreto.

Os sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos foram alterados nas diferentes concentrações analisadas do MPASe o que contribuiu para que não houvesse aumento da peroxidação lipídica e as alterações histopatológicas severas nas brânquias.

Os resultados deste estudo, no período proposto de 96 horas, mostraram que os metais dissolvidos em meio aquático podem ser absorvidos por *O. niloticus* e, dependendo da concentração, causar danos genotóxicos, respostas positivas do sistema imunológico e antioxidantes que poderiam ser prejudiciais se os animais forem expostos por longos períodos como pode acontecer no meio ambiente.

## **11. Perspectivas Futuras**

O experimento e as análises realizadas para esta dissertação contribuem para o entendimento dos efeitos que os metais e nanopartículas presentes no MPASe causam em órgãos-alvo nos peixes em um curto período de tempo e em diferentes concentrações.

Nossos resultados colaboram com o desenvolvimento de novas abordagens para o entendimento dos efeitos dos aglomerados de metais do MPASe sob influência das variações no tempo de exposição, do pH em experimentos estáticos ou semiestáticos além de exposições em estágios de desenvolvimento dos peixes. Além de incentivar análises futuras da bioacumulação nos órgãos-alvos dos peixes e a biodisponibilidade dos metais em diferentes condições da água e os possíveis efeitos danosos que podem ser causados nos peixes.

Os dados do presente trabalho e dos futuros trabalhos podem auxiliar na regulamentação ambiental para a emissão do MPASe através das análises das concentrações dos metais emergentes e daqueles metais não emergentes.

## Referências Bibliográficas

- ABDEL-KHALEK, A.A.; BADRAN S.R., MARIE M.A.S. Toxicity evaluation of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using hematological, bioaccumulation and histological biomarkers. **Fish Physiol. Biochem.** 42:1225–1236, 2016.
- ABDEL-MOHSIEN H.S.; MAHMOUD, M.A.M. Accumulation of Some Heavy Metals in *Oreochromis niloticus* from the Nile in Egypt: Potential Hazards to Fish and Consumers. **J. Environ. Prot.** (Irvine, Calif) 06:1003–1013, 2015.
- ALBERTS, B.; et al. **Biologia Molecular da Célula.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 1268p. 2010.
- ALMEIDA, E. A.; RIBEIRO, C. A. O. (Ed.). **Pollution and fish health in tropical ecosystems.** CRC Press, 2013.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res. Toxicol.** 343:121–135, 1995.
- Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.; Rainbow, P.S. (Eds). **Ecological Biomarkers: indicators of ecotoxicological effects.** CRC Press. New York. USA. 464p. 2012.
- ARRIVABENE, H.P.; et al. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environ. Pollut.** 215:302–313, 2016.
- ARRIVABENE, H.P.; et al. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. **Chemosphere** 127:27–34, 2015.
- ATLI, G.; et al.. Response of catalase activity to Ag<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 143C (2), 218–224, 2006.
- ATLI, G. ; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 25, 33-38, 2008.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 29:113–123, 2006.
- BONOMO, M.M., et al. Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. **Environ Pollut** 268. 2021a.
- BRADESCO. **Mineração e Siderurgia.** Depec 1–102. Disponível em: [https://www.economiaemdia.com.br/BradescoEconomiaEmDia/static\\_files/pdf/pt/monitores/setorial/infset\\_mineracao\\_siderurgia.pdf](https://www.economiaemdia.com.br/BradescoEconomiaEmDia/static_files/pdf/pt/monitores/setorial/infset_mineracao_siderurgia.pdf) . Acesso em 14 de Abril de 2019.
- BRANDÃO, F.; et al. Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish *Liza aurata* through a triad approach: Bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress. **Metallomics** 7:1352–1363. 2015.

CAMPBELL, T.W. **Exotic Animal: Hematology and Cytology**, 4a. Wiley Blackwell. 2015.

CAPPELLO, T.; et al. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining <sup>1</sup>H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. **Sci. Total Environ.** 548–549:13–24, 2016.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L., MYERS, M.S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Can. J. Fish Aquat. Sci.** 47:2123–2136, 1990.

CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture.** 109–117, 2006.

CARVALHO, C.S.; BERNUSSO, V.A.; FERNANDES, M.N. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). **Aquatic Toxicology** 167, 220–227, 2015.

CARVALHO, C.S., et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere** 89, 60–69, 2012.

CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol Environ Saf** 52:83–91, 2002.

CHADWICK, O.A.; et al. Changing sources of nutrients during four million years of ecosystem development. **Nature.** 397:491–497. 1999.

CHAPPAZ, A.; et al. Isotopic fingerprints of anthropogenic molybdenum in lake sediments. **Environ. Sci. Technol.** 46:10934–10940. 2012.

CHELLAPPA, S., et al. Dynamics of territorial behaviour and gonad development in the hybrid red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus* (Osteichthyes: Cichlidae). **Biol. Semiarid. Trop. Fish** 59–73. 2014.

CHEN, W.H., et al. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. **Gen. Comp. Endocrinol.** 126:90–100, 2002.

COLLINS, A.R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutat. Res. Repair** 336:69–77, 1995.

CONAMA 357 (2005) Resolução CONAMA N° 357, De 17 De Março De 2005\* (Retificada). Cons Nac do Meio Ambient 36.

CORRÊA, S.A.S. et al. Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. **Toxicol. Environ. Chem.** 99:482–491. <https://doi.org/10.1080/02772248.2016.1189554>. 2017.

DALZELL, D. J. B.; MACFARLANE, N. A. A. The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. , 55(2), 301–315, 1999.

DONAHOE, R.J.; LIU, C. Pore water geochemistry near the sediment-water interface of a zoned, freshwater wetland in the southeastern United States. **Environ. Geol.** 33:143–153, 1998.

EPA (USA Environmental Protection Agency), Creed J, Brockhoff C, Martin TD. Method 200.8 Determination of Trace Elements in Waters and Wastes By Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U. US **Environ. Prot. Agency** 4:1–57, 1994.

ERGENE, S.; et al. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): Genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology** 16:385–391, 2007.

ESTEBAN, M.A.; et al. Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. **Biology (Basel)**. 4:907–922, 2015.

FIRAT, Ö.; BOZAT, R.C. Assessment of biochemical and toxic responses induced by titanium dioxide nanoparticles in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**. 2018.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen** 455:81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc** 2:1084–1104, 2007

FORTES, W.M.P.A. Bioacumulação de metais presentes no material particulado atmosférico sedimentável em tilápia-do-Nilo. Dissertação. UFSCar, 71p. 2021.

FRENZILLI G.; NIGRO M.; LYONS, B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutat. Res. - Rev Mutat Res** 681:80–92, 2009.

GRANT, K.R. Fish Hematology and Associated Disorders. **Vet. Clin. North Am – Exot. Anim. Pract.** 18:83–103, 2015.

HAMZA-CHAFFAI, A.; AMIARD-TRIQUET, C. A.E.A. Metallothionein-Like Protein : Is It an Efficient Biomarker of Metal Contamination? A Case Study Based on Fish From the Tunisian Coast. **Arch. Contam. Environ. Toxicol.** 62:53–62, 1997.

HODGKINSON, J.W.; GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Biology of bony fish macrophages. **Biology (Basel)** 4:881–906. 2015.

HUBER. P.C.; ALMEIDA, W.P., FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova** 31:1170–1179, 2008.

IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria J Med** 54:287–293, 2018.

MACHADO, M.; et al. A new methodology to derive settleable particulate matter guidelines to assist policy-makers on reducing public nuisance. **Atmos. Environ.** 182:242–251, 2018.

MAZON A.F.; et al. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian J Biol** 62:621–631, 2002.

MCDONALD, D.G.; WOOD C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin J.C., Jensen F.B. (eds) *Fish Ecophysiology*. **Chapman & Hall Fish and Fisheries Series**, vol 9. Springer, Dordrecht, 1993.

MCKNIGHT, I.M. A Hematological Study on the Mountain Whitefish, *Prosopium williamsoni*. **J. Fish Res. Bd. Can.** 23:95–111, 1996.

MEDEIROS, A.P.T.; CHELLAPPA, S.B.; YAMAMOTO, M. Agonistic and reproductive behaviors in males of red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) x *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) (Osteichthyes: Cichlidae). 67:701–706, 2007.

MORON S.E.; et al. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina. **J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.** 1:27–30. 2006.

NORDBERG M. Metallothioneins: Historical review and state of knowledge. **Talanta** 46:243–254, 1998.

NUSSEY G., VAN VUREN J.H.J., DU PREEZ H.H. Effect of copper on blood coagulation of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). **Comp Biochem Physiol Part C Comp** 111:359–367, 1995

OLIVEIRA M.; et al. Hepatic metallothionein concentrations in the golden grey mullet (*Liza aurata*) - Relationship with environmental metal concentrations in a metal-contaminated coastal system in Portugal. **Mar. Environ. Res.** 69:227–233, 2010.

PROSPERO, J.M.; et al. Environmental characterization of global sources of atmospheric soil dust identified with the Nimbus 7 Total Ozone Mapping Spectrometer (TOMS) absorbing aerosol product. **Rev Geophys** 40:2-1-2–31. 2002.

RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. **Comp. Biochem. Physiol Part A Mol. Integr. Physiol.** 124:S62. 1999.

RAVI S., et al. Aeolian processes and the biosphere. **Rev. Geophys** 49:1–45, 2021.

RIBEIRO, A.M.; et al. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiol. Biochem.** 40:645–657, 2014.

RIMA (2017) UTEI Vitória - Relatório de Impacto Ambiental

ROGERS, J.T.; et al. Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Am J. Physiol – Regul. Integr. Comp. Physiol.** 289:463–473, 2005.

ROGERS, J.T.; RICHARDS, J.G.; WOOD, C.M. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat Toxicol** 64:215–234, 2003.

- RUAS, C.B.G., et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 71:86–93, 2008.
- SAKURAGUI, M.M. et al. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environ. Pollut.** 178:41–51, 2013.
- SAYADI, M.H., et al. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in blackfish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology, **Chemosphere** 247, 2020.
- SANTOS, J.M. et al. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 24:22026–22039, 2017.
- SCHRECK, CARL B.; et al. **Biology of Stress in Fish**, 1st edn. Elsevier Inc. 2016.
- SERIANI, R.; et al. Relationship between water toxicity and hematological changes in *Oreochromis niloticus*. **Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.** 15:47–53. 2012.
- SHAH, N.; et al. Genotoxic Consequences in Common Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella* Valenciennes, 1844) Exposed to Selected Toxic Metals. **Biol. Trace Elem. Res.** 199:305–314, 2021.
- SHARMA, J.; LANGER, S. Effect of Manganese on haematological parameters of fish, *Garra gotyla gotyla*. ~ 77 ~ **J Entomol Zool Stud** 2:77–81. 2014.
- SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environ. Int.** 37:1083–1097, 2011.
- SILVA, G.F. et al. **Tilápia do Nilo - Criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná Curitiba.** 292. 2015.
- SINGH, M.; et al. Iron mediated hematological, oxidative and histological alterations in freshwater fish *Labeo rohita*. **Ecotoxicol Environ Saf** 170:87–97, 2019.
- SINGH, N.P.; et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175:184–191. 1988.
- SOARES, M.P et al. Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, 2022.
- SOUZA, I.C.; et al. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Sci. Total Environ.** 640–641:501–511, 2018.
- SOUZA, I.C.; et al. Matching pollution with adaptive changes in mangrove plants by multivariate statistics . A case study , *Rhizophora mangle* from four neotropical mangroves in Brazil. **Chemosphere** 108:115–124, 2014.
- SOUZA, I. C.; et al. Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. **Sci. Total Environ.** 658:798–808, 2019.

SOUZA, I.C.; et al. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. **Sci. Total Environ.** 753:141976, 2021.

SOUZA, I.C.; et al. Changes in bioaccumulation and translocation patterns between root and leaves of *Avicennia schaueriana* as adaptive response to different levels of metals in mangrove system. **Mar. Pollut. Bull** 94:176–184, 2015.

SOUZA, I.C., et al. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environ. Pollut.** 180:136–144, 2013.

SOUZA, I.C.; et al. Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). *Nat line* 9:54–58. 2011.

SUCHANA, S.A., et al. Chromium Exposure Causes Structural Aberrations of Erythrocytes, Gills, Liver, Kidney, and Genetic Damage in Striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **Biol. Trace Elem. Res.** 2020.

TAVARES-DIAS, M. et al. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. **Acta Sci. Biol. Sci.** 26:73–80. 2004.

TORRES, A. Agentes Oxidantes e Antioxidantes. Porto Alegre: UFRGS 8–11. 1993.

UEDA, I.K., et al. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.** 34:270, 1997.

VAN PITTIUS, M.G.; VAN VUREN, J.H.J.; DU PREEZ, H.H. Effects of chromium during pH change on blood coagulation in *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). **Comp. Biochem. Physiol. Part. C.**, Comp 101:371–374, 1992.

VIARENGO, A.; et al. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Mar. Environ. Res.** 44:69–84, 1997.

WALKER, C.H. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. **Environ. Health Perspect** 106:613–620, 1998.

WEI, K.; YANG, J. Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkia*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 113, 446–453, 2015.

WILSON, R. W. **Aluminum. Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals**, 67–123, 2011.

WITESKA, M. Erythrocytes in teleost fishes: A review. **Zool. Ecol.** 23:275–281, 2013.

WITESKA, M. Stress in Fish-Hematological and Immunological Effects of Heavy Metals. **Electron J. Ichthyol.** July 1:35–41. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Environmental Health Criteria** 155. *Environ Heal Criteria* 82. 1993.

YUAN G., et al. Highly Dynamic Polynuclear Metal Cluster Revealed in a Single Metallothionein Molecule. **Research** 2021:1–11, 2021.

ZHANG, S.; et al. Co-benefits of energy efficiency improvement and air pollution abatement in the Chinese iron and steel industry. **Energy** 78:333–345, 2014.