

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS (PPG-ERN)**

Rafaella Monteiro

**Efeito do material particulado atmosférico sedimentável
oriundo de área industrial siderúrgica em órgãos do robalo-
peva (*Centropomus parallelus*): Bioconcentração, estresse
oxidativo e histopatologias**

São Carlos

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS (PPG-ERN)

Rafaella Monteiro

Efeito do material particulado atmosférico sedimentável oriundo de área industrial siderúrgica em órgãos do robalo-peva (*Centropomus parallelus*): Bioconcentração, estresse oxidativo e histopatologias

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 requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marisa N. Fernandes

Coorientadora: Dr^a Iara da Costa Souza

São Carlos

2023



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 da candidata Rafaella Monteiro, realizada em 28/02/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Helen Sadauskas Henrique (UNISANTA)

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino (UFNT)

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

Dedico aos meus pais,
razão do meu viver, seres que
me inspiram e me trazem força.
AMO VOCÊS ATÉ O CÉU

Agradecimentos

Nem cabe na palavra. Expande-se, apodera da vida, do que sei sobre me sentir bem, ter pessoas com quem se possa dividir o fruto amargo, o doce, o precioso, e o nem tanto. Passaram pessoas pelo meu caminho durante toda a jornada e o que tiro de todas essas passagens é que sempre encontramos pessoas que precisamos encontrar e meu agradecimento vai a elas.

Antes de tudo agradeço aos meus pais, Aline e Marco Monteiro, minha base de tudo, sem eles nada disso seria possível. Pai, obrigada por todo ensinamento, pela construção de caráter, por sempre dar o melhor para o meu ensino e para minha educação. Mãe, minha melhor amiga, sempre dando o melhor para tudo. Torço para um dia ser 1% da mulher que você é. Não tenho palavras para agradecer vocês por tudo, serei imensamente grata e espero poder retribuir tudo o que fizeram por mim um dia. **ESSA CONQUISTA É NOSSA!!**

Aos meus irmãos, Mayara e Murillo, e meu cunhado (quase um irmão também) Átila, meu muito obrigada por torcerem, apoiarem e estarem em cada fase dessa caminhada comigo. Ao meu sobrinho, Noah, que ainda não conheço, mas já mudou nossas vidas, trazendo alegria e preenchendo nossa família. Essa conquista também é de vocês!

Ao meu amor, Celso, muito obrigada por me fazer imensamente feliz. Nosso amor é singular, e eu espero vivê-lo para sempre. Eu sinto muito orgulho do nosso crescimento e estou ansiosa pelo que ainda vamos viver juntos. We have everything when we have each other.

Aos meus amigos de infância, Janine, Dayane, Nicolli, Andressa e Akio, meu obrigada por viverem comigo (mesmo que há alguns quilômetros de distância) a maior conquista da minha vida. Obrigada pelas conversas, pelas festas e boas histórias que vivemos.

Agradeço por essa amizade linda que construímos juntos. Amo cada particularidade de vocês.

À minha orientadora, Marisa, uma mulher ímpar, que tenho uma grande admiração, respeito e encantamento pela pessoa e pelo trabalho que exerce, meus agradecimentos pela oportunidade e pelos ensinamentos.

À minha coorientadora, Iara, que foi além da coorientação, fez papel de anjo, de amiga, as vezes de mãe, e as vezes de filha. Não tenho como agradecer todo esse empenho em me ajudar e me dar um norte. Eu vou levar para a vida cada coisa que vivemos juntas. Não posso me esquecer que junto de você existe uma duplinha especial também: Tarcísio e Diego, obrigada por terem sido companhia e salva-vidas em muitos momentos durante minha estadia em São Carlos. Nunca esquecerei, e quero que saibam que podem contar comigo pra qualquer coisa.

Ao professor Fabiano, mil vezes obrigada por ter feito com as próprias mãos toda a instalação do laboratório para que eu pudesse realizar meu experimento, obrigada pela paciência, pela confiança e os conselhos. E, não poderia me esquecer do Natan e Jordan que “moveram estuários” atrás dos meus robalinhos, e por terem me ajudado (muito) na estadia em Pontal e em cada detalhe dentro do laboratório. Vocês são um belo time e tenho certeza de que enriqueceram muito nossa equipe.

Aos laços que fiz durante esses dois anos, Carol, Michelly, Luana, Hevelyn, Carolzinha, Maira, Will e Gustavo: Vocês são um timão! Amei trabalhar com cada um. Agradeço de coração toda ajuda e conselhos que recebi, e cada crise de riso também. Tenho certeza que se não fosse vocês essa caminhada teria sido muito mais difícil.

Aos professores Mari e Vini, que também fazem parte dessa construção de conhecimento. Quero que saibam que eu tenho uma grande admiração pela pessoa e profissionais que são. Obrigada por terem me ajudado, e digo com veracidade que esse projeto não teria

sido finalizado sem ajuda de vocês, a Mari com a fatídica bioquímica e o Vini com a sua estatística descomplicada.

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro durante esses 24 meses. A todos os componentes do programa de pós-graduação de Ecologia e Recursos Naturais. E, também, aos membros da ong JUNTOS SOS Ambiental por me fornecer a matéria prima de todo esse trabalho.

Além disso, minhas gratidões às equipes de outros laboratórios que tive a oportunidade de trabalhar, pessoal da Universidade Federal de São Paulo, professor Camilo, Felipe, Andressa, Marina e, aos professores da Universidade Nacional de Córdoba, Magdalena e Daniel.

Agradeço carinhosamente à dois professores que foram responsáveis por virar a chavinha: Rafael Noletto e Larissa Romanello. Obrigada pelo incentivo que sempre recebi. Há muitas coisas que vocês me disseram que levo comigo até hoje. Eu não estaria aqui se lá atrás vocês não acreditassem em mim. Hoje, vocês são minhas fontes de inspiração.

E, por fim, mas não menos importante à Professora Denisinha, que em suas aulas brilhantes trazia alegria e conhecimento. É uma honra para mim, ter sido sua aluna por anos de Arriva. Obrigada por ter inspirado a mim e a tanta gente. Você é luz!

Obrigada. Obrigada. Obrigada!

- Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra,

(Ernest Hemingway).

Lista de figuras

Figura 1. Transferência de metais na cadeia trófica a partir da sedimentação de material particulado atmosférico sedimentável liberados por indústrias siderúrgicas.	19
Figura 2. Esquema da absorção-excreção de xenobióticos nos metabolismos dos peixes.....	23
Figura 3. Elementos que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa que inclui antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos para eliminação de metais.	24
Figura 4. Região da Ilha do Boi, localizado na grande Vitória, ES, Região contaminada por MPASe.	28
Figura 5. Exemplar de Robalo-peva (<i>Centropomus parallelus</i>). Autor: Nathan de Souza Vieira.	29
Figura 6. Esquema do delineamento experimental, CN: Tratamento controle, sem adição de MPASe; T₁: Tratamento 1, adição de 0,01 g L ⁻¹ de MPASe; T₂: Tratamento 2, adição de 0,1 g L ⁻¹ de MPASe; e T₃: Tratamento 3, adição de 1 g L ⁻¹ de MPASe.....	32
Figura 7. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), nível de glutathione-S-transferase (GST), conteúdo de glutathione (GSH) e nível de peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias de <i>Centropomus parallelus</i> expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios ± erro padrão, Letras diferentes indicam diferença significativa em relação ao controle (ANOVA, p < 0,05; n = 10).	53
Figura 8. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), nível de glutathione-S-transferase (GST), conteúdo de glutathione (GSH), metalotioneína (MT), nível de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC) de hepatopâncreas de <i>Centropomus parallelus</i> expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios ± erro padrão erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, p < 0,05; n = 10).	55
Figura 9. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), nível de glutathione-S-transferase (GST), conteúdo de glutathione (GSH) e nível de peroxidação lipídica (LPO) nos rins de <i>Centropomus parallelus</i> expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, p < 0,05; n = 10).	56

- Figura 10.** Atividade da enzima catalase (CAT), nível de glutathione-S-transferase (GST), nível de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC) de músculo branco de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$)..... 57
- Figura 11.** Atividade da enzima catalase (CAT), nível de glutathione-S-transferase (GST), conteúdo de glutathione (GSH), nível de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC) de músculo vermelho de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$)..... 58
- Figura 12.** Histologia branquial de *C. parallelus*, **A.** Grupo controle (0 g L^{-1} MPASe), estruturas apresentando características normais da lamela (L), células pilares (seta), filamento (F). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. Histopatologia branquial em *C. parallelus* após a exposição ao MPASe por 96 horas. **B.** Hiperplasia do epitélio lamelar (seta), deslocamento epitelial (*). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. **C.** Fusão parcial lamelar (seta). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. **D.** Dilatação dos espaços capilares (*). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. Coloração: Azul de toluidina. 63
- Figura 13.** Índice de lesões nas brânquias ($I_{\text{Lbrânquias}}$) de *C. parallelus* após exposição ao MPASe. Dados apresentados como média \pm erro padrão. 65
- Figura 14.** Histologia de hepatopâncreas de *C. parallelus*. **A.** Grupo controle, (0 g L^{-1} MPASe), estruturas apresentando características normais com hepatócitos normais com núcleos (setas). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$; **B.** Tecido adiposo (*) Barra de escala: $20 \mu\text{m}$; **C.** Hipertrofia nuclear (HN). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. Coloração Azul de toluidina e fucsina básica..... 66
- Figura 15.** Índice de lesões ($I_{\text{Lhepatopâncreas}}$) registradas em hepatopâncreas de *C. parallelus* antes e após exposição ao MPASe. Dados apresentados como média \pm erro padrão. 68
- Figura 16.** Histologia renal de *C. parallelus*, **A.** Estrutura morfológica normal de rins com glomérulos (seta); túbulos renais (*). Barra de escala: $50 \mu\text{m}$. Histopatologia renal em *C. parallelus* após exposição ao MPASe. **B.** Hipertrofia celular (*); hipertrofia nuclear (seta) Barra de escala: $10 \mu\text{m}$, Coloração: Azul de toluidina e fucsina básica..... 69
- Figura 17.** Índice de lesões (I_{Lrins}) registradas em rins de *C. parallelus* antes e após exposição ao MPASe. Dados apresentados como media \pm erro padrão. 70

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores médias das variáveis físicas e químicas da água nos tanques de experimentação: temperatura, pH, nível de amônia e condutividade da água durante o período de exposição.	32
Tabela 2. Alterações histológicas e patologias das brânquias usadas para avaliação. ...	38
Tabela 3. Alterações histológicas e patologias de hepatopâncreas usadas para avaliação.	39
Tabela 4. Alterações histológicas e patologias de rins usadas para avaliação.....	39
Tabela 5. Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) no material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) coletado na Ilha do Boi, Vitória, ES, Brasil, em outubro/2020 (n=1)	42
Tabela 6. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$, mediana (Q1-Q3) de metais dissolvido na água experimental do grupo controle (0,0 $\mu\text{g MPASe L}^{-1}$) e expostos ao material particulado atmosférico (MPASe) após 96 h (n=1).....	43
Tabela 7. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) nas brânquias de <i>Centropomus parallelus</i> após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).	45
Tabela 8. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) no hepatopâncreas de <i>Centropomus parallelus</i> após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).	46
Tabela 9. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) nos rins de <i>Centropomus parallelus</i> após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).	48
Tabela 10. Concentração de metais ($\mu\text{g g L}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) no músculo vermelho de <i>Centropomus parallelus</i> após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).	50
Tabela 11. Concentração de metais ($\mu\text{g g L}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) no músculo branco de <i>Centropomus parallelus</i> após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).	52
Tabela 12. Valores significativos de brânquias obtidos através da análise de correlação de Spearman.	59
Tabela 13. Valores significativos de hepatopâncreas obtidos através da análise de correlação de Spearman.....	60

Tabela 14. Valores significativos de rins obtidos através da análise de correlação de Spearman.....	60
Tabela 15. Valores significativos de músculo branco obtidos através da análise de correlação de Spearman.....	61
Tabela 16. Valores significativos de músculo vermelho obtidos através da análise de correlação de Spearman.....	61
Tabela 17. Índice de cada lesão (I _L) registradas nas brânquias de <i>C. parallelus</i> após exposição ao MPASe.....	63
Tabela 18. Índice de cada lesão (I _L) registradas nos hepatopâncreas de <i>C. parallelus</i> após exposição ao MPASe.....	67
Tabela 19. Lesões morfológicas registradas nos rins de <i>C. parallelus</i> após a exposição ao MPASe.	69

Lista de abreviações

CAT- catalase

CDNB – 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno

EDTA – ácido etilenodiamino ter-á-acético

EROs - espécies reativas de oxigênio

Es – base de estágios

Fi – fator de importância

GPx – glutathiona peroxidase

GSH – glutathiona

GST – glutathiona-S-transferase

IAH – índice de alteração histológica

IL – índice de lesão

LPO – lipoperoxidação lipídica

MPA – material particulado atmosférico

MPA_{Se} – material particulado atmosférico sedimentável

MT – metalotioneína

PC – Proteína carbonilada

SOD - superóxido dismutase

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Contaminação ambiental.....	17
1.2	Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPASe).....	18
1.3	Peixes - Organismos Bioindicadores	20
1.4	Marcadores bioquímicos e morfológicos.....	22
1.5	MPASe na região de Vitória (ES, Brasil)	25
2	HIPÓTESES	26
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Coleta do material particulado atmosférico	27
4.2	<i>Centropomus parallelus</i>	28
4.3	Peixes e condições experimentais	30
4.4	Delineamento experimental	31
4.5	Análise química dos constituintes do MPA, água experimental, brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos de <i>C. parallelus</i>	33
4.5.1	Dessalinização da água experimental para determinação de metais	34
4.6	Determinação de enzimas e moléculas antioxidantes, peroxidação lipídica e proteínas carboniladas.....	34
4.7	Análise Histopatológica.....	36
4.8	Análise estatística	40
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Caracterização do MPASe e bioconcentração dos metais nos órgãos.....	40

5.2	Enzimas e moléculas antioxidantes, peroxidação lipídica e proteínas oxidadas	52
5.2.1	Brânquias.....	53
5.2.2	Hepatopâncreas	54
5.2.3	Rins.....	56
5.2.4	Músculo branco	57
5.2.5	Músculo vermelho.....	58
5.3	Análise de Correlação de Spearman	59
5.4	Biomarcadores morfológicos	62
5.4.1	Brânquias	62
5.4.2	Hepatopâncreas.....	65
5.4.3	Rins.....	68
6	DISCUSSÃO	71
6.1	Caracterização e bioconcentração do MPASe	71
6.2	Biomarcadores bioquímicos em órgãos de <i>C. parallelus</i>	74
6.3	Biomarcadores morfológicos em órgãos de <i>C. parallelus</i>	79
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

Resumo

A liberação de fumaça metálica por indústrias metalúrgicas contamina o meio aéreo e aquático. O aumento de metais no meio aquático pode gerar desequilíbrio e desenvolver patologias nos organismos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a bioconcentração de metais presentes no material particulado atmosférico sedimentável (MPASe), as respostas antioxidantes e alterações histopatológicas em brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos (vermelho e branco) do peixe estuarino robalo-peva, *Centropomus parallelus*. Os peixes foram expostos a concentrações ambientalmente relevantes considerando dados de MPASe do Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - IEMA (0,0; 0,01; 0,1 e 1g L⁻¹ de MPASe) por 96 horas, em sistema estático. Nos quatro órgãos foram determinados a atividade da superóxido dismutase (SOD), exceto músculo, catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-S-transferase (GST), o nível de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO). No hepatopâncreas foi também determinado o nível de metalotioneína (MT) e de proteínas carboniladas (PC). Histopatologias foram determinadas nas brânquias, hepatopâncreas e rins. Os resultados mostraram um acúmulo de metais nos peixes no hepatopâncreas > rins > brânquias > músculos. O ferro e zinco foram os metais que mais acumularam. Os marcadores bioquímicos mostraram que houve ativação do primeiro sistema de defesa antioxidante, a SOD teve uma alteração significativa nas brânquias e hepatopâncreas, a CAT foi alterada no hepatopâncreas e rins e a GPx teve alteração significativa somente no hepatopâncreas. O conteúdo de GSH e a atividade de GST foi alterado nos rins e músculo branco. A LPO apresentou alterações nos músculos branco e vermelho, e PC foi alterada somente no músculo branco. Em relação aos marcadores morfológicos foi observado hiperplasia do epitélio lamelar e do filamento, fusão parcial lamelar das brânquias. No hepatopâncreas foram registradas alterações estruturais no parênquima e hipertrofia de hepatócitos, enquanto nos rins ocorreram hipertrofia nuclear e celular. A incidência das alterações indica que os efeitos gerados pelo MPASe são reversíveis, entretanto podem torna-se graves caso sejam mais recorrentes, principalmente em concentrações iguais ou superiores a 0,1 g L⁻¹ MPASe. Por isso, reforça-se a necessidade de criar normativas que impeçam ou diminuam a emissão desse material no meio atmosférico.

Palavras-chave: Metais; peixes neotropicais; meio aquático; biomarcadores; contaminação atmosférica.

Abstract

The release of metallic smoke by metallurgical industries contaminates the air and water environment. The increase of metals in the aquatic environment can develop imbalance and pathologies in organisms. In this context, the aim of this study was to evaluate the bioconcentration of metals present in sedimentable atmospheric particulate matter (MPASe), such as antioxidant responses and histopathological changes in gills, hepatopancreas, kidneys and muscles of estuarine fat snook fish, *Centropomus parallelus*. The fish were exposed to environmentally relevant concentrations (0.0; 0.01; 0.1 and 1 g L⁻¹ of MPASe) for 96 hours, in a static system. In the four organs, the activity of superoxide dismutase (SOD) was determined, except muscle, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), the level of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO). In the liver, the level of metallothionein (MT) and carbonyl proteins (PC) was also determined. Histopathologies were determined in the gills, hepatopancreas and kidneys. The results showed that the accumulation of metals in fish in the hepatopancreas > kidneys > gills > muscles. Fe and Zn were the metals that most accumulated. While the biochemical markers showed that in the gills only SOD (0.1 g L⁻¹) had a significant decrease, in the hepatopancreas, the activity of SOD (1 g L⁻¹) and CAT (0.01; 0.1; 1 g L⁻¹) decreased while GPx (1 g L⁻¹) increased. In those exposed, CAT (1 g L⁻¹) and GST (1 g L⁻¹) activity increased, as did the GSH content (0.1 and 1 g L⁻¹). White muscle increased GSH content (0.01 and 1 g L⁻¹) and GST activity (0.01 and 0.1 g L⁻¹) and LPO levels (0.01 g L⁻¹). In the red muscle, there was an increase in LPO (0.1 g L⁻¹) and PC (0.01 and 0.1 g L⁻¹). In the gills, lesions such as hyperplasia of the lamellar epithelium and filament, partial lamellar fusion and necrosis were more frequent after exposure to 0.1 g L⁻¹ of MPASe. In the hepatopancreas, altered alterations in the parenchyma and hypertrophy of hepatocytes were registered, while in the kidneys, nuclear and cellular hypertrophy occurred. The incidence of alterations indicates that the effects generated by MPASe are reversible, however they can become serious if they are more recurrent. Therefore, the need to create regulations that prevent or reduce the emission of this material into the atmosphere is reinforced.

Keywords: Metals; neotropical fish; half aquatic; biomarkers; atmospheric contamination.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação ambiental

A ocorrência de metais é comum em diferentes ambientes porque é parte integrante do solo e rochas (Chen et al., 2021). Alguns metais são considerados essenciais para a vida biológica, uma vez que os organismos necessitam de quantidades específicas para o bom funcionamento fisiológico e, se insuficientes ou excessivas, podem causar desequilíbrios metabólicos. Outros, são considerados tóxicos, mesmo em quantidades muito pequenas pois podem alterar o metabolismo e processos fisiológicos (Chen et al., 2021; Garai et al., 2021; Ajala et al., 2022),

Entretanto, com o crescimento industrial, agrícola e urbano, as concentrações dos metais têm aumentado no ambiente e seus efeitos foram potencializados (Chen et al., 2021; Garai et al., 2021). Estudos indicam que os metais como um dos principais problemas globais da atualidade, uma vez que são os causadores de poluição de água potável, de alimentos e do solo e, conseqüentemente, responsáveis por gerar riscos a biodiversidade da fauna e flora (Rehman et al., 2021; Tsai et al., 2021; Ajala et al., 2022).

Rehman e colaboradores (2021) descrevem os metais como responsáveis por danificar raízes, folhas e componentes celulares de plantas, como também afetar respectivas fotossínteses e balanço hídrico. Nos solos, esses elementos podem causar um desequilíbrio microbiológico e reduzir a fertilidade (Garai et al., 2021). Ajala e colaboradores (2022) mostram que esses metais podem bioacumular em fígado e rins de peixes, além de estudos que trazem compilados de registros de alterações no metabolismo humano, com danificações da membrana e do DNA, incluindo alterações das ações enzimáticas (Witkowska et al., 2021).

Apesar dos metais participarem de processos naturais, os efeitos gerados para os organismos dependem muito da dose, concentração e tempo de exposição, podendo ser agravado pelas variações do ambiente decorrentes das mudanças climáticas (Rehman et al., 2021; Stark et al., 2022; Ajala et al., 2022). Além disso, o potencial de bioacumular na cadeia trófica torna a natureza desses elementos ainda mais perigosa (Garai et al., 2021).

Os metais são elementos naturais encontrado na crosta terrestre e em diferentes ambientes (Chen et al., 2021) e fazem parte de ciclos biogeoquímicos do ambiente sendo encontrados também nos ecossistemas aquáticos. Atividades domésticas, da agricultura e industriais são responsáveis por impactar direta e indiretamente o ambiente aquático. Diretamente por descarga de esgoto e escoamento agrícola e, indiretamente por partículas de contaminantes metálicos suspensas no ar que ao sedimentarem contaminam todo o ambiente terrestre aquático (Arrivabene et al., 2015, Souza et al., 2018 b, 2019).

1.2 Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPASe)

O material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) são resíduos eliminados, via chaminés das fábricas, que se depositam no solo e na água. Partículas que possuem diâmetro $<10 \mu\text{m}$, denominadas PM₁₀ e PM_{2,5}, em geral, ficam suspensas no ar contaminando o ambiente aéreo, apesar de também ocorrer sedimentação devido a ventos e/ou durante o período de chuvas. O MPASe é caracterizado por partículas $> \text{PM}_{10}$. Independentemente do tamanho do MPASe, partículas podem se dissociar em meio aquoso em metais e nanopartículas metálicas ($< 200 \text{ nm}$) contaminando os ecossistemas aquáticos e a biota (Soares et al., 2022; De Angelis et al., 2022). A figura 1 exemplifica como pode acontecer a transferência de metais no ecossistema, podendo

biomagnificar ao longo da cadeia trófica. A figura resume os resultados obtidos por Souza e colaboradores (2021 c) que analisou a transferência e acúmulo de metais (B, Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ag, As, Se, Rb, Sr, Pb e Hg) em diferentes organismos constituintes de 3 cadeias tróficas identificadas nos dois estuários da região de Vitória, ES: planta-caranguejo-peixe, plâncton-camarão-peixe e camarão-ostra. Os resultados mostraram que há transferências dos metais entre esses organismos e que a teia planta-caranguejo-peixe tem maior potencial de acúmulo de metais. Além disso, a transferência de metais varia de acordo com os insumos antropogênicos que afetam esses locais,

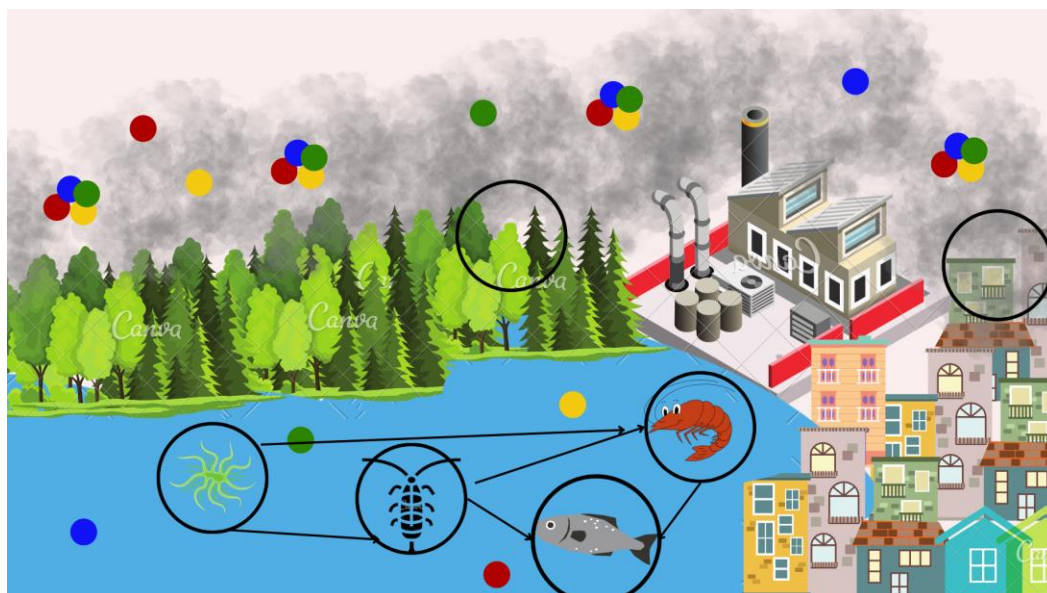


Figura 1. Transferência de metais na cadeia trófica a partir da sedimentação de material particulado atmosférico sedimentável liberados por indústrias siderúrgicas.

A dissociação do MPASe na água facilita a absorção de metais e/ou nanopartículas pela biota, que alcançando a corrente sanguínea pode ser distribuída por todo o organismo e acumular nos órgãos, gerando vários efeitos deletérios à saúde.

Embora, essa dissociação aconteça em níveis subletais – sem causar episódios de mortalidade – a contínua deposição de MPASe pode promover uma redução no desempenho dos animais (Soares et al., 2022; De Angelis et al., 2022). A toxicidade gerada pelo excesso de partículas metálicas é o tema de muitos estudos que demonstram

redução na capacidade reprodutiva (Chakraborty, 2021), ação cancerígena (Steinhagen et al., 2004), afetando o sistema nervoso periférico que conseqüentemente afeta a interação dos peixes no ambiente (Paschoalini e Bazzoli, 2021), a capacidade imune do animal (Soares et al., 2022), a eficiência respiratória (De Angelis et al., 2022), função cardíaca (Adorno et al., 2023) e causando genotoxicidade (Souza, 2022).

Além disso, há estudos que indicam que a população humana pode ser afetada por essas partículas metálicas, direta e indiretamente. A via direta ocorre pelo sistema respiratório, onde registros científicos mostraram que essas partículas podem gerar quadros de necrose e apoptose de células pulmonares (Morozesk et al., 2021, Galvão et al., 2023). A outra via é indireta, a partir da cadeia trófica, através do consumo alimentar de metais acumulados em peixes que tem sido intensivamente associado a esses fatores (Ajala et al., 2022).

1.3 Peixes - Organismos Bioindicadores

A contaminação do ambiente gera diretamente um desequilíbrio na fisiologia dos animais e/ou populações que vivem nesses meios. Esses organismos que respondem a alterações ambientais são chamados de organismos bioindicadores sendo importantes em estudos que buscam avaliar os impactos ecológicos (Naigaga et al., 2011).

Espécies aquáticas são utilizadas para avaliar a qualidade da água, dado que esses organismos são seres sensíveis a mudanças do ambiente aquáticos e a poluição (Birungi et al., 2007). Eles podem indicar o nível de contaminação do local através de marcadores celulares/bioquímicos, fisiológicos e morfológicos em cada indivíduo. Atualmente, o uso de marcadores em órgãos e tecidos desses animais tem sido utilizados para avaliar como

os organismos respondem a contaminação. As brânquias, fígado/hepatopâncreas e rins de peixes são órgãos-alvo para estudos ecotoxicológicos (Xu et al., 2022).

A brânquia é considerada um órgão multifuncional, sendo importante para a respiração, regulação osmótica e equilíbrio ácido-base e é considerada como a porta de entrada de poluentes em peixes de água doce por terem grande superfície de contato com o meio aquático e distância de difusão água-sangue muito pequena. Podem ser ótimos modelos para avaliar os riscos que o ambiente e o animal enfrenta (Xu et al., 2022) e onde iniciam os efeitos tóxicos nos peixes (Jiao et al., 2019; Xu et al., 2022).

O fígado, é órgão dos peixes mais utilizados em estudos para avaliar a toxicidade em animais. É conhecido pela função de armazenamento de nutrientes e por ter um importante papel no processo de detoxificação e metabolizar vários xenobióticos, além da função como órgão imunológico ligada a resposta imune inata do metabolismo (Carvalho et al., 2022). É um órgão formado por uma matriz primária de hepatócitos, canalículos biliares e vasos sinusoides. No geral, os peixes possuem um parênquima hepático circundado por uma camada de tecido conjuntivo denso formando septos que se subdividem em lobos (Causey et al., 2018; Long et al., 2022; Carvalho et al., 2022). O papel do hepatopâncreas dos peixes é de degradar metabolicamente os xenobióticos – desintoxicando e/ou biotransformando. O fígado/hepatopâncreas é considerado o órgão que mostram os primeiros sinais de alterações e lesões morfológicas causadas pelas mudanças ambientais e poluição (Carvalho et al., 2022).

Os rins são órgãos compostos por néfrons que filtram o sangue, absorvem água e nutrientes, além de excretar outras substâncias; é responsável por parte da regulação osmótica e sais nos peixes e importante para a manutenção do meio interno quanto ao

equilíbrio hidroeletrólítico e excreção de xenobióticos. Os rins são órgãos que podem ser afetados pelos contaminantes do ambiente (Carvalho et al., 2022).

Os músculos dos peixes são a parte comestível por humanos e a maior porção da massa corpórea dos animais. O sistema locomotor dos peixes é altamente especializado e por isso pode ser dividido de acordo com as fibras: brancas, vermelhas e rosas (Santos, 2007). Atualmente, diversos estudos envolvendo análise de poluição aquática tem usado amostras de músculos de peixes para avaliar a saúde do ambiente e o nível de acumulação de xenobióticos que podem ser causadores de riscos à saúde humana (Monferran et al., 2016; Griboff et al., 2017; Garnero et al., 2020).

1.4 Marcadores bioquímicos e morfológicos

O uso de marcadores bioquímicos em espécies de peixes tem sido muito aplicado nos estudos de monitoramento ambiental, uma vez que, os organismos aquáticos são sensíveis a alterações no meio aquático (Fernandes et al., 2012). As respostas bioquímicas mostram as primeiras alterações em organismos expostos ao xenobiótico como os metais e metalóides.

Alguns metais, denominados essenciais, fazem parte de processos fisiológicos fundamentais para os organismos, mas em concentrações muito altas podem ser tóxicos. Metais não essenciais não desempenham papel fisiológico e quando são absorvidos podem se ligar a sítios pertencentes a metais essenciais e alterar processos metabólicos e fisiológicos causando toxicidade que pode exceder o tolerável para o animal (Rainbow & Luoma, 2011). A assimilação dos metais pelos peixes ocorre a partir da ingestão das partículas suspensas na água ou por alimentos, ou ainda, por trocas de íons vias membranas lipofílicas – brânquias e tecidos – e por adsorção na superfície da membrana

(Garai et al., 2021; Ajala et al., 2022) (Figura 2). Metais, metalóides e nanopartículas metálicas podem afetar vias metabólicas das células dependendo do nível de contaminação ambiental e bioacumular nos tecidos e órgãos. Para eliminar esses elementos do meio intracelular, as células degradam ou biotransformam os xenobióticos (Barreiros et al., 2006; Souza et al., 2018 a; Gutiérrez-Martínez et al., 2020; Tavares et al., 2020; Morais et al., 2021).

Os processos de detoxificação celular desempenham papel importante na manutenção do potencial redox de forma a evitar o estresse oxidativo. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) são a primeira linha de defesa antioxidante do organismo e as moléculas como glutathione (GSH) e metalotioneína (MT) atuam como antioxidantes (Barreiros et al., 2006; Yadav, 2010; Jain et al., 2016). Outra importante enzima é a glutathione-S-transferase (GST), uma enzima de biotransformação de fase II, responsável por tornar os contaminantes mais hidrossolúveis para poderem ser eliminadas do organismo mais facilmente (Barbosa et al., 2010).

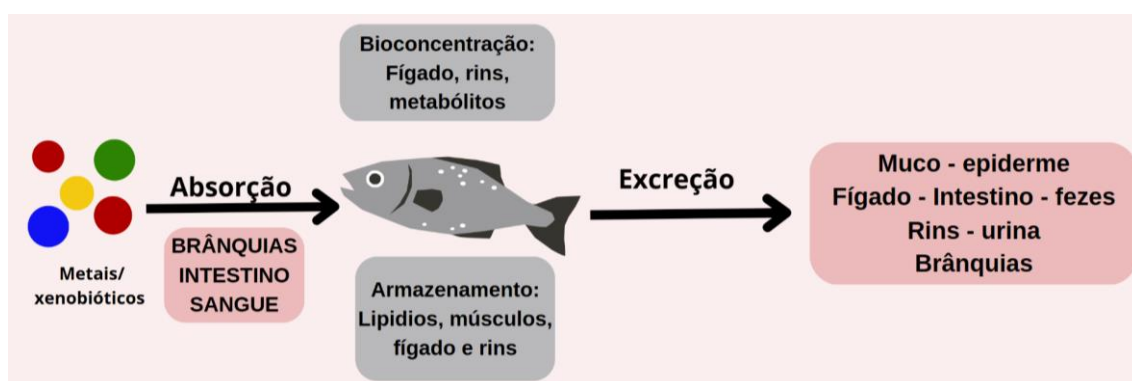


Figura 2. Esquema da absorção-excreção de xenobióticos nos metabolismos dos peixes.

Os primeiros agentes causadores de danos nas células geralmente são as espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila que são produzidas pelas mitocôndrias dentro das células dos organismos

(Lambert e Brand, 2009). Quando a produção de espécies reativas de oxigênio é maior do que a capacidade do sistema antioxidante em neutralizar essas moléculas ocorre o estresse oxidativo (Barreiros et al., 2006; Tavares et al., 2020) (Figura 3). Portanto, a avaliação das respostas antioxidantes e dos danos oxidativos de organismos aquáticos expostos ao MPASe, em condições controladas, é importante para determinar as concentrações que geram ou não respostas biológicas.

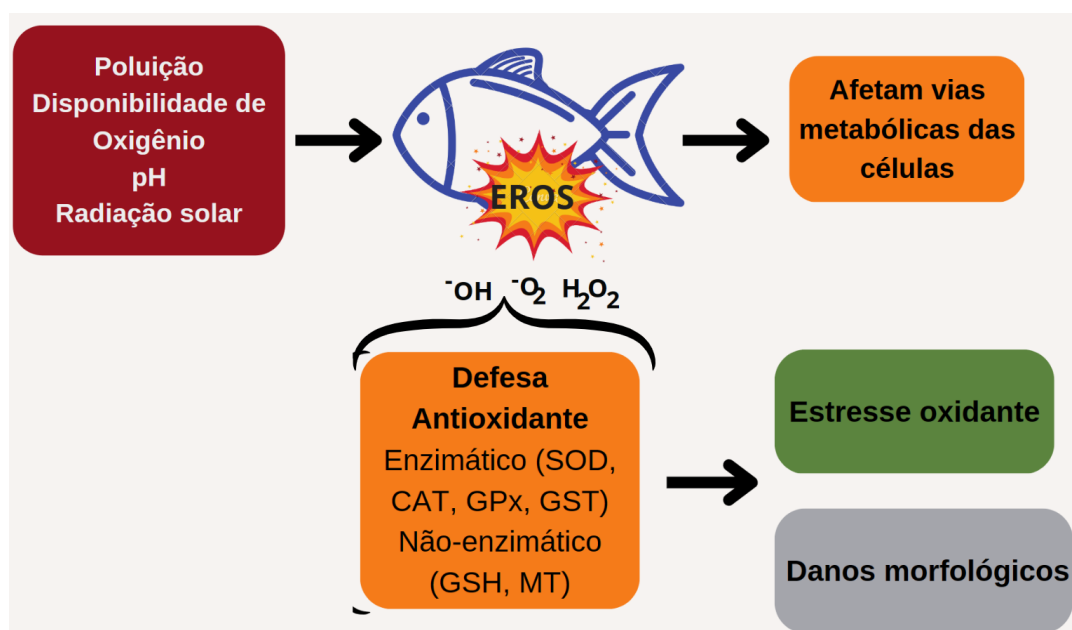


Figura 3. Elementos que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa que inclui antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos para eliminação de metais.

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células dos organismos pode gerar uma oxidação de biomoléculas ocasionando histopatologias (Fatima et al., 2015). Essas anomalias morfológicas são ferramentas para avaliar a acumulação de tóxicos nos tecidos (Chovanec et al., 2003), pois trata-se de análises das patologias causadas na estrutura do tecido corporal a nível microscópico (Lakra et al., 2019).

As alterações a nível tecidual podem fornecer informações dos potenciais impactos ambientais. A avaliação final é o exame microscópico dos tecidos-alvo por meio de

histopatologias (Fatima et al., 2015). Além de lesões teciduais, pode ser observado quadros de necroses, infecções, doenças e presença de parasitas como reação defensiva inflamatória dos animais (Vinodhini e Narayanan, 2009).

Órgãos como as brânquias, fígado, rins e pele dos peixes são muito usados em análises de alterações morfológicas (Fatima et al., 2015; Abiona et al., 2019; Reboa et al., 2019; Lakra et al., 2019), principalmente por serem órgãos responsáveis pelas funções vitais (reprodução, respiração e excreção) dos peixes (Lakra et al., 2019).

1.5 MPASe na região de Vitória (ES, Brasil)

Diversas regiões do Brasil têm contaminação por materiais emitidos por atividades industriais (Fontenele et al., 2009; Molisani et al., 2013). Na região de Vitória, estado do Espírito Santo, indústrias siderúrgicas responsáveis pelo transporte e pelletização de minério de ferro e produção de aço emitem no ar compostos químicos e material particulado (MP) com constituição metálica denominado popularmente “pó preto” (Abreu et al., 2017; Santos et al., 2017; Galvão et al., 2018; Costa et al., 2019).

Estudos isotópicos e nanocristalográficos realizados em estuários e manguezais desta região evidenciaram a presença de metais e nanopartículas metálicas em diferentes organismos, incluindo plantas e animais com o mesmo perfil encontrado no MPASe emitido pelas siderúrgicas locais, e foi demonstrado a transferência de metais, incluindo metais emergentes, via cadeia trófica, até os peixes (Arrivabene et al., 2015; Souza et al., 2018 b; Souza et al., 2021 b, c). Estes estudos confirmaram não apenas a contaminação dos estuários e manguezais por MPASe quanto dos organismos que neles vivem (Souza et al., 2018 b; 2019).

Entretanto, não são somente os animais que são diretamente impactados pelo MPA. A população também sofre com o excesso de metais no ambiente, estudos mostraram a internalização de nanopartículas metálicas indicando potencial interação com a estrutura celular e processos biológicos. Foi demonstrado, *in vitro*, através de estudos de nanocristalografia, a presença de metais (Ti, Bi e Ce - a partir do material particulado atmosférico) em células pulmonares humanas (MRC-5). Os efeitos gerados no meio intracelular foram citotóxicos e genotóxicos frente a Cr, Fe, Ni, Al, Pb e Hg que alteraram lisossomos e DNA estrutural (Souza et al., 2022).

2 HIPÓTESES

- Hipótese nula: Os metais presentes no material particulado atmosférico sedimentável não bioacumulam no organismo, não altera o sistema antioxidante em brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos e a histologia de brânquias, hepatopâncreas e rins de *C. parallelus*, após exposição de 96 horas.
- Hipótese alternativa: Os metais presentes no material particulado atmosférico sedimentável bioacumulam no organismo, altera o sistema antioxidante em brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos e a histologia de brânquias, hepatopâncreas e rins de *C. parallelus*, após exposição de 96 horas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo determinar a bioconcentração de metais, alterações no sistema antioxidante e danos morfológicos em órgãos de *Centropomus*

parallelus (robalo-peva), exposto a concentrações ambientalmente relevantes de MPASe por 96 horas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar e quantificar os metais e metalóides presentes no MPASe;
- Determinar e quantificar os metais e metalóides dissolvidos na água após a exposição por MPASe;
- Determinar a bioconcentração dos metais e metalóides em brânquias, hepatopâncreas e rim, músculo branco e vermelho de *C. parallelus*, após 96 horas de exposição ao MPASe;
- Determinar alterações no sistema antioxidantes nos órgãos de *C. parallelus*, analisando a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), nível da glutathione reduzida (GSH), metalotioneína (MT), lipoperoxidação lipídica (LPO) e proteína carbonilada (PC).
- Avaliar os danos morfológicos em brânquias, hepatopâncreas e rim de *C. parallelus* após a exposição ao MPASe.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material particulado atmosférico

O MPASe foi coletado na Ilha do Boi, cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil, (20°17'03,8"S e 40°14'24,9"W) em outubro de 2020 (Figura 4). Esse local está separado do centro urbano e recebe pouca influência de material liberado pela emissão veicular, porém é diretamente impactada por atividades industriais desenvolvidas no Complexo do

Tubarão, local que inclui indústrias de pelotização de minério de ferro, siderurgia, mineração e exportação de ferro e aço na cidade de Vitória. O local possui uma certificação do INMETRO para monitoramento atmosférico.



Figura 4. Região da Ilha do Boi, localizado na grande Vitória, ES, Região contaminada por MPASe.

As coletas foram realizadas com o auxílio da organização não governamental JUNTOS SOS ES Ambiental. O MPASe foi coletado a 20 m de altura do solo em recipientes plásticos e armazenados em sacos plásticos até serem usados na experimentação, como de acordo com procedimentos descritos por Souza et al. (2021 a).

4.2 *Centropomus parallelus*

Cetropomus parallelus (Figura 5), é uma espécie considerada organismo-modelo em estudos que envolvem alterações do ambiente, uma vez que são sensíveis a mudanças do meio aquático (Ballesterro et al., 2017; Santos et al., 2021; Silva et al., 2022).



Figura 5. Exemplar de Robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Autor: Nathan de Souza Vieira.

Classificação sistemática da espécie:

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Centropomidae

Gênero: *Centropomus*

Espécie: *Centropomus parallelus* (Poey, 1860)

Os robalos são espécies protândricas e têm uma ampla distribuição geográfica – habitando desde a Flórida até a região sul do Brasil. Quando jovens, são machos e vivem em estuários apresentando adaptações fisiológicas que os permite suportar diferentes níveis de salinidade (Borges, 2010). Além disso, é muito apreciado na alimentação de humanos permitindo a contaminação indireta da população pelos elementos presentes no MPASe (Cerqueira, 2005).

O robalo é considerado um organismo modelo para este estudo, pois é encontrado nessas regiões contaminadas de Vitória e fazem parte de pratos típicos capixabas, que por

consequência, cada vez mais oferece riscos à saúde pública. Portanto, amostras de brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos de *C. parallelus* foram usados para a avaliação dos impactos ambientais gerados pelos metais constituintes do material particulado atmosférico liberado por siderúrgicas.

4.3 Peixes e condições experimentais

O presente estudo utilizou 80 exemplares juvenis de *C. parallelus* (Massa corpórea = 60.91 ± 0.18 g e comprimento total = 18.97 ± 0.03 cm, média \pm erro padrão). Os peixes foram capturados na região estuarina do litoral do estado do Paraná (Brasil) e aclimatados no laboratório do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná, em Pontal do Paraná, PR. A coleta dos exemplares de peixes foi autorizada por SISBIO nº 77713⁻¹. Os organismos foram aclimatados por 15 dias com alimentação *ad libitum* efetuada diariamente com peixes (*Astyanax sp.*) vivos. Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, a alimentação foi suspensa. Durante este período houve recirculação da água.

Três a quatro peixes foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques circulares de 310 L, de acordo com o recomendado pela OECD (2019), considerando 1g-peixe/L de água com aeração e aclimatados durante quinze dias em $23,0 \pm 2,4^\circ$ C e salinidade constante (20 ppt), fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, em sistema estático.

A água usada na aclimação e durante os experimentos foi coletada em mar aberto a aproximadamente 20 km de distância dos estuários. Esta captação ocorreu naturalmente, passando somente por uma camada superior de areia do fundo do mar e, em seguida, a uma manta composta por polipropileno que reveste toda a tubulação de captação impedindo a entrada da areia nos sistemas de bombeamento. Após a captação, a água

circulou somente dentro dos tanques com filtragem biológica até o momento do início dos experimentos.

4.4 Delineamento experimental

A exposição de *C. parallelus* ao MPASe foi realizada nos mesmos tanques de aclimatação em sistema estático, por 96 h. Os peixes (n = 10 em cada tratamento) foram submetidos a 4 tratamentos: controle (CN), sem adição de MPASe (0,0 g L⁻¹ MPASe); tratamento 1, com adição de 0,01 g L⁻¹ de MPASe; tratamento 2, com adição de 0,1 g L⁻¹ de MPASe; e tratamento 3, com adição de 1,0 g L⁻¹ de MPASe. As concentrações utilizadas são ambientalmente relevantes considerando os dados de MPASe do Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA, 2021). O delineamento experimental foi realizado duas vezes, seguindo exatamente as mesmas etapas, de forma que foram expostos um total de 40 animais por vez, de forma a respeitar 1g-peixe/L, como as diretrizes da OECD (2019) (Figura 6).

Os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos em experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) n° 12/2021 da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

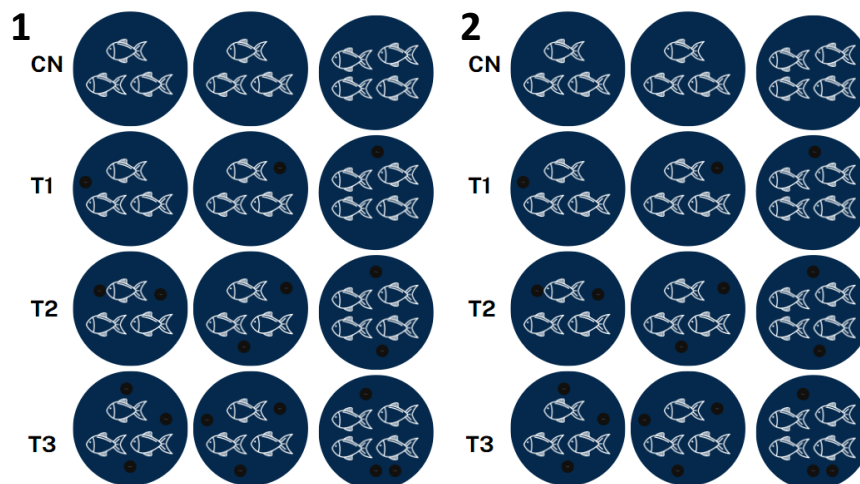


Figura 6. Esquema do delineamento experimental, **CN:** Tratamento controle, sem adição de MPASe; **T₁:** Tratamento 1, adição de 0,01 g L⁻¹ de MPASe; **T₂:** Tratamento 2, adição de 0,1 g L⁻¹ de MPASe; e **T₃:** Tratamento 3, adição de 1 g L⁻¹ de MPASe.

Durante o período de exposição foram controladas as variáveis físicas e químicas da água nos tanques com 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L⁻¹ de MPASe, (Tabela 1) e coletados 40 mL de água da coluna d'água para realização da análise elementar. O controle das variáveis e a coleta de água foram realizadas a 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de experimento.

Tabela 1. Valores médias das variáveis físicas e químicas da água nos tanques de experimentação: temperatura, pH, nível de amônia e condutividade da água durante o período de exposição.

	0,0 g L⁻¹	0,01 g L⁻¹	0,1 g L⁻¹	1 g L⁻¹
Temperatura (°C)	22,6 ± 1,3	22,6 ± 1,25	22,6 ± 1	22,6 ± 1,01
pH	7,8 ± 0,14	7,8 ± 0,22	7,8 ± 0,5	8,0 ± 0,15
Amônia (ppm)	0,01±0,008	0,02 ± 0,006	0,02 ± 0,005	0,02 ± 0,0005
Condutividade (mS cm⁻¹)	24,74 ± 0,3	24,96 ± 0,2	24,84 ± 0,2	24,82 ± 0,2

A aeração (5 mg L⁻¹) e salinidade (20 ppt) foram constantes durante o período de exposição.

Após 96 horas de exposição ao MPASe, os animais foram eutanasiados com overdose de benzocaína (1 g: 10 L), seguida de secção medular. As brânquias,

hepatopâncreas, rins, músculo vermelho e músculo branco foram removidos. As amostras para análise química foram armazenadas em freezer a -20 °C. Para análises bioquímicas, as amostras foram armazenadas inicialmente em nitrogênio líquido e, em seguida mantidas em freezer a -80 °C e, para análises histológicas as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e mantidas em temperatura ambiente.

4.5 Análise química dos constituintes do MPA, água experimental, brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos de *C. parallelus*.

Amostras do MPASe (0,1 g de peso seco) e de brânquias, hepatopâncreas e rins foram digeridas em sistema fechado, usando digestor microondas MARS 6 230/60, com 4 mL de ácido nítrico, 1 mL de ácido clorídrico ambos sub-boiling e filtradas em filtros de nitrocelulose 0,45 µm de acordo com descrito por EPA et al. (1994). Todas as amostras passaram pelo mesmo procedimento e as amostras digeridas foram transferidas para tubos de polietileno sendo armazenadas a 4 °C até a 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). O ICPM-MS analisa vários elementos em concentrações menores a 1 µg L⁻¹, simultaneamente de forma rápida e precisa (Matos, 2021). As análises foram realizadas no Instituto de Tecnologia e Ciência Alimentar de Córdoba (YCITAC - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para o preparo da análise, usou-se 2 mL de amostra digerida, adicionadas à 20 µL da solução padrão interno e 8 mL de água acidificada à 2%.

Foram analisados 27 metais: Alumínio (Al); Titânio (Ti); Vanádio (V); Cromo (Cr); Manganês (Mn); Ferro (Fe); Níquel (Ni); Cobre (Cu); Zinco (Zn); Arsênio (As);

Selênio (Se); Rubídio (Rb); Estrôncio (Sr); Ítrio (Y); Zircônio (Zr); Nióbio (Nb); Prata (Ag); Cádmio (Cd); Estanho (Sn); Bário (Ba); Lantânio (La); Cério (Ce); Tungstênio (W); Mercúrio (Hg); Chumbo (Pb) e Bismuto (Bi), Ouro (Au). As análises foram feitas em triplicata de acordo com a método 200,8 (USEPA, 2009). O controle de qualidade foi feito utilizando material de referência certificado (CRM: MR-Agro E3002A, July 2020). A recuperação do CRM foi $89 \pm 18 \%$.

4.5.1 Dessalinização da água experimental para determinação de metais

As amostras de água experimental foram filtradas em fibras de vidro (Glass microfiber filters 47 nm, Whatman GF/C) e acidificadas até pH 2.

Para ativação da coluna (cartuxo), adicionou-se 10 mL de ácido nítrico 5%, em seguida adicionou-se 10 mL de H₂O ultrapura, posteriormente 5 mL de metanol, 5 mL H₂O ultrapura e, para finalizar, acrescentou-se 5 mL de acetato de amônio (0,01M). Em seguida, foi feita uma solução usando 40 mL de amostra de água experimental, 40 µL de hidroxidoquinolinona (8-HQ – M 146,18 g mol⁻¹) e ajustado pH para 8,0 usando solução de amônia 5 M e ácido nítrico 2M, como descrito no protocolo de Kellner et al. (1998).

Após a passagem da água pela coluna, as amostras foram transferidas para eppendorf 2,5 mL e armazenadas em freezer 4 °C até análise.

4.6 Determinação de enzimas e moléculas antioxidantes, peroxidação lipídica e proteínas carboniladas

Amostras de brânquias, hepatopâncreas, rins, músculos branco e vermelho foram homogeneizados com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,6) em sonificador ultrassônico de

ponteira (Eco-Sonics, QR500, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 10,000 g por 10 min a 4° C.

A concentração de proteínas das amostras foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e medida em absorbância de 595 nm em leitora de microplaca (SpectraMax M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA).

Em seguida, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona-S-transferase (GST), a concentração de glutaciona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO) foram determinadas em brânquias, hepatopâncreas e rins. A metalotioneína (MT) e proteínas oxidadas (OP) foram determinadas apenas em hepatopâncreas e, nos músculos foram determinados a catalase, glutaciona-S-transferase, glutaciona reduzida, peroxidação lipídica e proteína carbonilada. Todas as análises bioquímicas foram realizadas em leitora de microplaca (SpectraMax M5 Multi-Mode, Molecular Devices, USA).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada usando xantina oxidase para gerar radicais superóxido. A absorbância da redução de citocromo C foi a 550 nm e expressa em U SOD mg pt⁻¹ min⁻¹, de acordo com McCord e Fridovich (1969). A análise da CAT foi determinada usando solução de H₂O₂ (0,03 M). A decomposição do H₂O₂ foi determinada em absorbância 240 nm, durante 3 min, e sua atividade foi expressa em µmol H₂O₂ mg pt⁻¹ min⁻¹, conforme com Beutler (1982). A atividade da GPx foi determinada usando o T-Butil (Tert-Butylbenzene – 7,5 mM) para a oxidação de NADPH. A absorbância de 340 nm, foi medida por 3 min com intervalos de 15 s e foi expressa em nmol NADPH mg pt⁻¹ min⁻¹, como descrito por Beutler (1975). A atividade da GST foi determinada usando CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno – 1,33 mM) como

substrato. A absorvância foi determinada a 340 nm, medida por 4 min com intervalos de 20 s. A atividade da GST foi expressa em nmol CDNB mg pt⁻¹ min⁻¹, como descrito por Keen et al., (1976).

A concentração de MT foi quantificada a partir do conteúdo residual de SH usando reagente de Ellman (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB) a 412 nm. O conteúdo de MT foi expresso em nmol mg pt⁻¹, assim como descrito por Viarengo et al., (1997).

A concentração de GSH foi determinada usando NDA (2,3-naftalenodicarboxaldeído) reagindo com o GSH para formação da solução fluorescente. A reação foi determinada na absorvância 472 nm de excitação e 538 nm de emissão, e expressa em nmol mg⁻¹, como descrito por White et al., (2003).

A concentração de LPO foi determinada usando o método FOX, adicionando uma solução reativa com laranja de xilenol PM 760,58. A quantificação foi determinada em absorvância de 560 nm, e expressa em nmol mg pt⁻¹, como descrito por Jiang et al. (1991). As PC foram determinadas usando reagente DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazna) para reação com grupos carbonilas e formação de compostos conjugados de proteínas e dinitrofenil hidrazona, com absorção em 355, 358, 370 e 390 nm, expressa em nmol mg pt⁻¹ (Reznick e Packer, 1994).

4.7 Análise Histopatológica

Amostras de brânquias, hepatopâncreas e rins fixadas em gluteraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, e desidratadas com uma sequência crescente de etanol em água destilada (70 %, 80 %, 90 %, 95 % por 1 hora e incluídas em resina (Historesina Leica, Alemanha). As amostras foram embebidas em 95 % + resina básica com ativador por 4 horas, e em seguida, resina básica pura + ativador em *overnight*). Após esse

processo, as amostras são incluídas com resina + endurecedor em moldes próprios para inclusão em resina e, posteriormente foram colocadas em estufa à 37 °C, por 48 horas, para polimerização.

Os cortes das amostras foram realizados no micrótomo automático (HM 360, MICRON, EUA) usando navalhas de vidro. Os cortes foram realizados longitudinalmente a 3 µm de espessura. As lâminas de brânquias foram apenas com azul de toluidina por 60 s e as lâminas de rins foram coradas com azul de toluidina por 60 s e fucsina básica por 10 s. A análise dos cortes histológicos foi feita no microscópio OLYMPUS (U-TV0,63XC, Tokyo, Japão) e as imagens foram obtidas usando câmera de vídeo e o software Olympus DP2-B5W. As alterações histológicas nos cortes histológicos foram analisadas de acordo com Bernet et al. (1999).

O índice de cada lesão – IL - foi calculado de acordo com a frequência e a severidade das patologias encontradas nos órgãos analisados (Tabelas 2 à 4). As alterações histopatológicas foram classificadas com base na extensão das lesões (Ex) e fator de importância (Fi) que indica o estágio ou severidade da lesão. Ex depende da distribuição da lesão no órgão: 0. Ausência de lesão (0); 1. Lesão raramente presente (10-25%); 2. Lesão moderadamente frequente (25 a 50%); 3. Lesão frequente (50-75%) e 4. Lesão altamente frequente (75 a 100%). Fi indica a severidade da lesão e efeito na sobrevivência animal: 1. Lesão reversível com pouca importância; 2. Lesão reversível após remoção do agente estressor e moderada importância patológica e, 3. Lesão irreversível com alta importância patológica. O IL de cada lesão nos órgãos (IL) foi determinado como: $IL = Ex \times Fi$ e o IL de cada órgão como $IL_{org} = \sum Ex \times Fi$.

Tabela 2. Alterações histológicas e patologias das brânquias usadas para avaliação.

Patologias - Estágio 1	Patologias - Estágio 2	Patologias – Estágio 3
Hiperplasia do epitélio do filamento	Hiperplasia do epitélio lamelar	Necrose
Fusão total de 2 ou + lamelas	Ruptura do epitélio lamelar	
Fusão parcial de 2 ou + lamelas	Ruptura de células pilares	
Deslocamento do epitélio lamelar	Aneurisma lamelar	
Edema	Aneurisma apical (canal marginal)	
Congestão/Hiperemia lamelar		
Dilatação canal marginal		
Hiperplasia/Proliferação de ionócitos		
Hipertrofia de células mucosas		
Hiperplasia/Proliferação de células mucosas		
Enrolamento lamelar apical		
Atrofia do epitélio lamelar		

Patologias de estágio 1 (azul) têm fator de importância 1; Patologias de estágio 2 (amarelo) têm fator de importância 2; E patologias de estágio 3 (rosa) têm fator de importância 3.

Tabela 3. Alterações histológicas e patologias de hepatopâncreas usadas para avaliação.

Patologias - Estágio 1	Patologias - Estágio 2	Patologias – Estágio 3
Congestão/dilatação do sinusóides na circulação	Hipertrofia dos núcleos	Necrose de hepatócitos
Alterações estruturais e na arquitetura do parênquima	Degeneração nuclear	
Hipertrofia nos hepatócitos		
Depósitos intracelulares nos hepatócitos		
Acúmulo de lipídeos nos hepatócitos		
Glicogênio nos hepatócitos		
Tecido adiposo		

Patologias de estágio 1 (azul) têm fator de importância 1; Patologias de estágio 2 (amarelo) têm fator de importância 2; E patologias de estágio 3 (rosa) têm fator de importância 3.

Tabela 4. Alterações histológicas e patologias de rins usadas para avaliação.

Patologias – Estágio 1	Patologias – Estágio 2	Patologias – Estágio 3
Atrofia glomerular	Hipertrofia dos glomérulos	Necrose glomerular
Depósitos intracelulares	Atrofia/Núcleo picnótico dos glomérulos	Necrose das células túbulo biliar
Vacualização intracelular	Degeneração nuclear dos glomérulos	
Hipertrofia celular	Hipertrofia dos túbulos	
Dilatação da cápsula de Bowman	Atrofia/Núcleo picnótico dos túbulos	
Aumento de macrófagos	Degeneração nuclear dos túbulos	
Melanomacrófagos		

Alterações estruturais e arquitetura		
Hipertrofia nuclear		

Patologias de estágio 1 (azul) têm fator de importância 1; Patologias de estágio 2 (amarelo) têm fator de importância 2; E patologias de estágio 3 (rosa) têm fator de importância 3.

4.8 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. O software InfoStat (Di Rienzo et al., 2012) foi utilizado para as análises estatísticas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilks) e homogeneidade de variância. Diferenças entre as médias foram determinadas aplicando a análise de variância (ANOVA one-way) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O teste de correlação de Spearman foi calculado para relacionar os valores dos metais determinados nas brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos (branco e vermelho) entre si e com valores obtidos nas análises dos marcadores bioquímicos e foi reportado coeficientes acima de 0,50 com 95% limite de confiança ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do MPASe e bioconcentração dos metais nos órgãos

O MPASe é constituído por metais diferentes e tem concentrações diferentes de cada um deles. Dezesete metais foram quantificados. O Fe e Al são os que tem as maiores concentrações com valores superiores a $5000 \mu\text{g g}^{-1}$ de MPAS. As concentrações de Ti, Mn e Zn apresentaram valores entre 200 e $710 \mu\text{g g}^{-1}$ e os elementos V, Cr, Ni, Cu, Rb, Sr, Y, Zr, Sn, Ba, Ce e Pb apresentaram valores inferiores a $100 \mu\text{g g}^{-1}$. As, Se, Mo, Ag,

Cd, W, Au, Hg e Bi apresentaram valores abaixo do limite de detecção (LOD) desses metais. Nb foi identificado, mas apresentou valor menor que o limite de quantificação para esse metal. A Tabela 5 mostra a concentração dos metais no MPASe ($\mu\text{g g}^{-1}$). O MPASe não se dissolve totalmente na água e, parte do MPASe foi sedimentado no fundo do aquário.

A tabela 6 mostra as concentrações de metais dissolvidas na água controle e contaminada com MPASe após exposição de *C. parallelus*, por 96 h. Se e As não foram detectados no MPASe, mas foi quantificado dissolvido na água; V, Cr, Mn, Ni, Cu e Zn quantificados no MPASe não foram detectados na água, Ag, Cd, Hg, Mo, Nb, W e Bi não foram detectados no MPASe e nem dissolvidos na água.

Tabela 5. Concentração dos metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) no material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) coletado na Ilha do Boi, Vitória, ES, Brasil, em outubro/2020.

Elemento	Concentração de Metais no MPASe		
	$\mu\text{g g}^{-1}$	LOD	LOQ
Fe	106140,5	0,3919	0,9666
Al	6997,19	1,2907	2,7594
Ti	708,183	0,0363	0,0807
Mn	565,241	0,056	0,1512
Zn	211,671	0,0053	0,6541
Ba	88,149	0,0942	0,1037
Sr	68,496	0,0789	0,136
Cr	55,436	0,0513	0,1182
Cu	25,495	0,2548	0,0841
V	20,375	0,2545	0,3169
Ni	18,242	0,0627	0,1312
Ce	18,056	0,0031	0,0066
Pb	12,587	0,0423	0,094
La	9,006	0,0133	0,022
Y	5,323	0,0014	0,0033
Sn	4,945	0,021	0,55
Zr	3,831	0,0224	0,0491
Rb	2,215	0,3887	0,4476
As	<LOD	0,0166	0,0148
Se	<LOD	0,0073	0,0406
Nb	<LOQ	0,0041	0,0096
Mo	<LOD	0,0384	0,0864
Ag	<LOD	0,0412	0,107
Cd	<LOD	0,0415	0,077
W	<LOD	0,0024	0,0069
Hg	<LOD	0,0402	0,0727
Bi	<LOD	0,0856	0,239

Tabela 6. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$, mediana (Q1-Q3) de metais dissolvido na água experimental do grupo controle ($0,0 \mu\text{g MPASe L}^{-1}$) e expostos ao material particulado atmosférico (MPASe) após 96 h.

Elementos	MPASe (g L^{-1})			
	0,0 (controle)	0,01	0,1	1,0
Al	82,64 (81,79-83,38)	76,61 (74,88-78,35)	69,00 (68,95-69,67)	60,92 (60,70-61,29)
Ti	0,89 (0,73-0,91)	0,61 (0,49-0,67)	0,34 (0,33-0,39)	0,57 (0,46-0,66)
V	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
Cr	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Mn	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fe	17,11 (16,90-17,15)	12,56 (12,42-12,74)	11,80 (11,70-12,18)	21,89 (21,30-22,00)
Ni	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ
Cu	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Zn	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
As	9,51 (9,43-9,56)	1,56 (1,52-1,54)	9,05 (8,99-9,09)	1,50 (1,48-1,53)
Se	0,08 (0,07-0,09)	0,04 (0,03-0,07)	0,10 (0,08-0,12)	0,26 (0,22-0,7)
Rb	0,24 (0,23-0,25)	0,28 (0,27-0,29)	0,20 (0,19-0,20)	0,31 (0,29-0,31)
Sr	1,83 (1,89-1,84)	2,19 (2,17-2,21)	1,23 (1,21-1,24)	3,52 (3,50-3,55)
Y	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Zr	0,37 (0,36-0,37)	0,92 (0,92-0,94)	0,51 (0,51-0,52)	<LOD
Nb	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Mo	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ag	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Cd	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Sn	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Ba	30,60 (30,60-30,68)	32,30 (32,28-32,45)	30,19 (30,17-30,33)	27,59 (27,45-27,71)
La	0,21 (0,21-0,21)	0,10 (0,10-0,10)	0,08 (0,08-0,09)	0,08 (0,08-0,09)
Ce	0,93 (0,93-0,94)	1,28 (1,28-1,29)	0,82 (0,81-0,83)	1,14 (1,13-1,14)
W	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Hg	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pb	1,95 (1,93-1,96)	1,44 (1,42-1,44)	1,43 (1,42-1,44)	5,18 (5,16-5,19)
Bi	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Embora parte do MPASe se deposita no fundo do aquário, os metais dissolvidos na água bioacumularam nas brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos. As Tabelas 7 a 11 mostram as concentrações de metais nos órgãos analisados, Ag, Bi, Nb, Pb, Sn, W, Zr estavam abaixo de LOD ou LOQ em todos os órgãos analisados. As, Cd, Hg, Mo e Y não foram quantificados em brânquias, Mo e Hg não foram quantificados nos rins, Fe não foi detectado em músculo branco e As não foi detectado em músculo vermelho. Alguns metais não foram quantificados no grupo controle, mas após a exposição ao MPASe bioconcentraram nos órgãos analisados. A bioconcentração de metais variou dependendo do metal e órgão. Em brânquias e hepatopâncreas, as concentrações de Ti, Cr, Mn, Zn, Rb, Sr, Ba foram mais elevadas em peixes expostos a 0,1 g L⁻¹ MPASe do que nos expostos a 1 g L⁻¹ MPASe. No músculo branco, as concentrações de Ti, Cr, Mn, Zn e Ba também foram mais altas em peixes expostos a 0,1 g L⁻¹ MPASe. Entretanto, o músculo vermelho apresentou maiores concentrações de Al, Ti, V, Zn nos tratamento 0,01 g L⁻¹.

Tabela 7. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) nas brânquias de *Centropomus parallelus* após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).

Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MPASe (g L^{-1})			
	0,0	0,01	0,1	1
	1,29	6,01	11,65	6,80
Al	(1,29-5,77)	(1,29-8,53)	(3,59-37,55)	(4,57-24,09)
	0,03	0,34	2,34	1,39
Ti	(0,03-0,03)	(0,28-0,59)	(1,97-3,20)	(1,01-4,03)
	0,25		0,45	
V	(0,25-0,72)	LOD	(0,27-0,53)	LOD
	19,49		13,62	1,51
Cr	(0,05-182,76)	LOD	(9,54-14,97)	(0,05-3,03)
	1,96	0,459	2,94	3,95
Mn	(1,85-9,53)	(0,31-1,04)	(2,85-7,64)	(3,81-8,07)
	0,39	0,31	202,93	306,90
Fe	(0,39-692,72)	(0,31-95,79)	(0,31-349,16)	(185,88-454,51)
	4,70		3,00	
Ni	(0,06-69,43)	LOD	(2,36-4,002)	LOD
	2,61	0,78	0,65	10,52
Cu	(1,99-6,54)	(0,25-86,53)	(0,2-1,87)	(3,52-283,95)
	79,611	102,09	47,40	39,75
Zn	(77,95-112,10)	(80,51-106,53)	(34,07—95,81)	(0,00-46,06)
	0,01	1,37	1,53	1,48
Se	(0,01-0,10)	(1,18-1,58)	(1,33-1,89)	(1,30-1,51)
	8,39	3,52	5,11	7,32
Rb	(8,32-12,70)	(0,44-5,27)	(3,79-8,93)	(6,40-7,57)
	19,59	72,87	88,04	136,30
Sr	(16,05-30,82)	(14,01-78,33)	(56,81-94,58)	(37,53-139,94)
		0,56	0,10	1,13
Ba	LOD	(0,13-0,74)	(0,05-1,67)	(0,44-1,33)
	0,02	0,08	0,09	0,03
La	(0,02-0,02)	(0,02-0,08)	(0,08-0,13)	(0,01-0,04)
	0,03(0,00-	0,00	0,02	0,03
Ce	0,09)	(0,00-0,02)	(0,02-0,09)	(0,03-0,09)

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada metal permanecem os mesmos da Tabela 5.

Tabela 8. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) no hepatopâncreas de *Centropomus parallelus* após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).

Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MPASe (g L^{-1})			
	0,0	0,01	0,1	1
	1,29	16,31	29,51	58,85
Al	(1,29-36,78)	(8,42-40,18)	(3,90-61,92)	(14,91-70,09)
	0,03	0,20	2,02	0,03
Ti	(0,03-8,81)	(0,07-0,04)	(0,35-2,77)	(0,036-0,38)
	0,25	0,34	2,69	1,08
V	(0,25-0,46)	(0,31-0,39)	(0,25-4,95)	(0,38-1,59)
	0,05	0,05	2,69	1,26
Cr	(0,05-90,04)	(0,05-0,05)	(0,25-4,95)	(0,72-1,67)
	5,96	4,22	4,58	5,20
Mn	(0,05-8,63)	4,06-4,50)	(1,23-9,86)	(5,06-6,31)
	497,57	428,21	1909,01	2311,08
Fe	(0,31-3393,35)	(341,82-853,97)	(0,31-4441,00)	(1767,36-3654,91)
	0,06		10,83	0,15
Ni	(0,06-30,01)	LOD	(0,06-2,21)	(0,10-0,33)
	2,17	10,18	12,64	13,56
Cu	(0,25-18,68)	(7,46-12,96)	(0,73-17,54)	(7,53-14,40)
	5,48	73,87	55,90	74,98
Zn	(0,00-120,48)	(62,49-85,36)	(47,02-60,28)	(24,32-85,14)
	0,01	0,76	1,25	0,04
As	(0,01-0,57)	(0,72-1,99)	(1,80-2,39)	(0,01-10,83)
	0,86	5,58	4,81	8,86
Se	(0,00-6,57)	(4,88-5,62)	(3,57-6,40)	(5,20-10,83)
	2,15	3,64	8,21	5,89
Rb	(0,3810,83)	(2,80-4,63)	(7,52-36,66)	(4,44-6,77)
	5,56	15,46	7,32	3,35
Sr	(0,07-34,86)	(1,55-30,41)	(5,50-16,83)	(0,90-17,69)
	0,01	0,00	0,00	0,00
Y	(0,00-0,06)	(0,00-0,00)	(0,00-0,1)	(0,00-0,03)

		1,54	2,38	02,38
Mo	0,29)	(0,58-1,76)	0,08-4,39)	(1,16-35,15)
				0,07
Cd	LOD	LOD	LOQ	(0,04-0,35)
	0,09		0,09	0,09
Ba	(0,09-0,51)	LOD	(0,09-0,69)	(0,09-2,01)
	0,06	0,07	0,14	0,15
La	(0,01-0,16)	(0,03-0,10)	(0,05-0,24)	(0,04-0,23)
		0,09	0,08	0,25
Ce	0,18(0,00-0,25)	(0,01-0,12)	(0,00-0,27)	(0,06-0,43)
	0,24		0,88	0,36
Hg	(0,15-0,25)	LOD	(0,4-1,21)	(0,09-0,39)
	0,95			
Pb	(0,042-0,39)	LOD	LOD	LOD

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada metal permanecem os mesmos da Tabela 5.

Tabela 9. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) nos rins de *Centropomus parallelus* após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).

Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MPASe (g L^{-1})			
	0,0	0,01	0,1	1
	174,13	29,14	13,44	1,29
Al	(1,29-433,25)	(23,32-98,12)	(7,92-80,10)	(1,29-54,77)
	1,00	1,07	0,03	0,03
Ti	(0,03-4,56)	(0,54-3,26)	(0,03-0,03)	(0,03-0,19)
		3,21	1,24	1,48
V	LOQ	(0,58-8,39)	(1,02-1,26)	(0,73-1,70)
			19,32	1,77
Cr	LOD	LOD	(11,08-22,37)	(0,16-20,88)
	2,37	5,20	0,90	
Mn	(0,05-52,96)	(0,05-13,42)	(0,05-6,04)	LOD
	645,19	0,31	573,78	0,31
Fe	(0,39-28603,46)	(0,31-0,31)	(233,32-878,68)	(0,31-560,48)
			6,56	0,06
Ni	LOD	LOD	(3,70-7,73)	(0,06-8,71)
	7,77	0,25	3,78	0,25
Cu	(0,25-92,40)	0,25-9,99)	(0,25-30,39)	(0,25-1,56)
	3263,24	3319,17	2389,25	1640,86
Zn	(637,97-5961,24)	(917,85-4268,89)	(1166,38-2626,62)	(1114,62-1789,05)
	7,51	6,97	8,14	0,66
As	6,81-13,59)	(0,01-28,12)	(1,50-13,14)	(0,1-8,43)
	21,39	12,36	5,36	4,63
Se	(16,10-94,35)	(2,65-20,74)	(5,11-9,33)	(3,53-5,19)
	17,95	13,14	44,41	7,11
Rb	(0,38-51,45)	(5,03-15,65)	(0,44-8,80)	(5,39-9,00)
	45,82	336,15	25,30	162,63
Sr	(38,,24-78,45)	(36,79-930,13)	20,23-72,47)	(22,15-185,17)
	0,14	0,00	0,02	0,00
Y	(0,00-0,23)	(0,00-0,03)	(0,00-0,6)	(0,00-0,05)
Mo	0,80	LOD	0,21	LOD

	(0,08-31,13)		(0,08-0,32)	
	0,52			0,09
Ba	(0,09-5,63)	LOD	LOD	(0,09-1,42)
	0,65	0,54	0,33	0,14
La	(0,02-1,17)	(0,32-0,56)	(0,26-0,41)	(0,07-0,29)
	1,66	0,34	0,24	0,38
Ce	(0,56-1,89)	(0,31-0,35)	(0,18-0,43)	(0,13-0,68)

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada metal permanecem os mesmos da Tabela 5.

Tabela 10. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) no músculo vermelho de *Centropomus parallelus* após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).

Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MPASe (g L^{-1})			
	0,0	0,01	0,1	1
	64,69	10,27	10,24	1,29
Al	(7,30-105,39)	(3,77-58,52)	(4,47-11,01)	(1,09-1,29)
	4,54	1,31	0,96	0,77
Ti	(1,32-5,07)	(1,03-2,95)	(0,37-1,17)	(0,62-0,95)
	0,25	0,14	0,10	0,11
V	(0,15-0,2)	(0,12-0,28)	(0,09-0,17)	(0,07-0,14)
			1,15	0,05
Cr	LOD	LOD	(0,85-1,70)	(0,04-0,29)
	1,13	0,68	0,05	0,64
Mn	(0,05-3,86)	(0,63-2,13)	(0,05-1,54)	(0,05-1,00)
			0,39	
Fe	LOD	LOD	(0,39-45,24)	LOD
			0,27	
Ni	LOD	LOD	(0,24-0,49)	LOD
	13,93	0,66	0,19	1,75
Cu	(0,25-23,14)	(0,51-1,05)	(0,10-0,25)	(0,55-3,83)
		20,93	6,41	10,36
Zn	LOD	(19,67-32,67)	(0,00-7,35)	(6,15-22,67)
	0,68	0,93	0,55	0,93
Se	(0,63-0,77)	(0,62-1,14)	(0,47-1,52)	(0,56-1,57)
	7,71	8,30	4,09	8,11
Rb	(7,7-9,31)	(2,89-11,35)	(2,52-7,52)	(4,39-14,32)

	19,25	22,21	7,37	19,36
Sr	(16,97-31,72)	(5,56-37,48)	(1,77-21,80)	(3,85-70,01)
	0,02	0,00	0,00	
Y	(0,02-0,04)	(0,00-0,02)	(0,00-0,00)	LOD
	0,87	0,35	0,09	0,22
Ba	(0,60-1,20)	(0,20-0,60)	(0,03-0,19)	(0,03-0,62)
	0,07	0,02	0,01	
La	(0,06-0,41)	(0,02-0,07)	(0,01-0,03)	LOQ
	0,11	0,00	0,00	0,00
Ce	(0,06-0,41)	(0,00-0,12)	(0,00-0,02)	(0,00-0,00)

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada metal permanecem os mesmos da Tabela 5.

Tabela 11. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca, mediana (Q1-Q3)) no músculo branco de *Centropomus parallelus* após exposição a 0,0; 0,01; 0,1 e 1 g L^{-1} MPASe após 96 h (n=3).

Elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$)	MPASe (g L^{-1})			
	0,0	0,01	0,1	1
Al	LOD	LOD	6,33 (0,58-14,77)	LOD
Ti	0,30 (0,16-1,05)	0,59 (0,14-0,67)	0,68 (0,37-8,36)	0,67 (0,58-0,93)
V	LOD	LOD	0,28 (0,06-0,47)	0,04 (0,03-0,06)
Cr	LOD	LOD	1,12 (0,66-2,97)	LOD
Mn	LOD	LOD	2,49 (0,11-19,90)	0,14 (0,05-0,24)
Fe	LOD	LOD	0,39 (0,39-709,46)	LOD
Ni	LOD	LOD	00,87 (0,66-0,97)	LOD
Cu	1,18 (0,25-4,73)	0,50 (0,25-1,40)	0,81 (0,01-7,74)	0,39 (0,14-1,60)
Zn	24,30 (0,05-46,67)	47,54 (11,32-52,05)	20,51 (8,21-96,27)	12,81 (12,07-14,87)
As	LOD	LOD	0,08 (0,01-0,16)	0,07 (0,01-0,31)
Se	0,85 (0,59-2,11)	0,85 (0,85-1,33)	0,76 (0,48-2,28)	1,26 (1,14-1,29)
Rb	9,24 (6,79-17,01)	5,34 (4,58-11,13)	1,14 (1,13-4,61)	8,69 (8,20-10,48)
Sr	16,88 (8,85-54,60)	1,86 (1,32-2,99)	3,54 (0,95-1398,58)	3,27 (1,78-10,11)
Y	LOD	LOD	0,00 (0,00-0,00)	LOD
Ba	0,12 (0,09-0,67)	0,09 (0,09-0,33)	0,14 (0,09-3,60)	0,08 (0,05-0,09)
La	0,02 (0,01-0,03)	0,01 (0,01-0,03)	0,02 (0,02-0,02)	LOQ
Ce	LOD	LOD	0,02 (0,00-0,02)	LOD

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) de cada metal permanecem os mesmos da Tabela 5.

5.2 Enzimas e moléculas antioxidantes, peroxidação lipídica e proteínas oxidadas

Nenhum animal morreu durante e após exposição de 0,01, 0,1 e 1 g L^{-1} de MPASe por 96 horas.

5.2.1 Brânquias

Nas brânquias, as atividades da CAT, GPx e GST não foram alteradas ($p > 0,05$), a atividade da SOD diminuiu 55,83 % após exposição a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de MPASe em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 7). Os níveis de GSH e LPO não foram alterados ($p > 0,05$) (Figura 7).

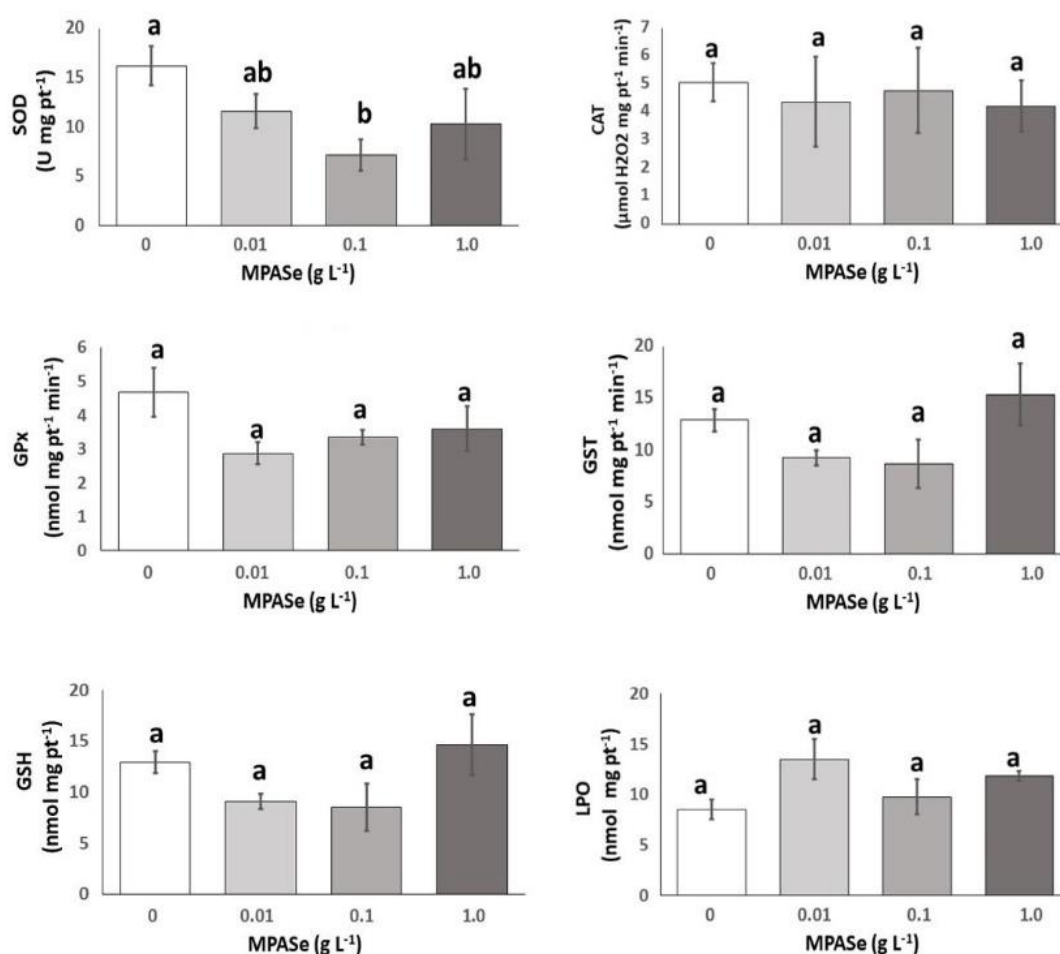


Figura 7. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), nível de glutaciona-S-transferase (GST), conteúdo de glutaciona (GSH) e nível de peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios \pm erro padrão, Letras diferentes indicam diferença significativa em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$).

5,2,2 Hepatopâncreas

No hepatopâncreas, a atividade da SOD diminuiu 28,71 % no grupo exposto a 1 g L⁻¹ de MPASe quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figuras 8). A atividade da CAT foi aproximadamente 47 % menor nos tratamentos 0,01; 0,1 e 1 g L⁻¹ MPASe, em relação ao controle ($p < 0,05$) e a atividade da GPx aumentou 312 % no tratamento 1,0 g L⁻¹ MPASe quando comparado ao controle ($p < 0,05$). A GST não alterou ($p > 0,05$). O nível de GSH e MT não foram alterados ($p > 0,05$). Os níveis de LPO e PC não foram significativamente diferentes do controle ($p > 0,05$).

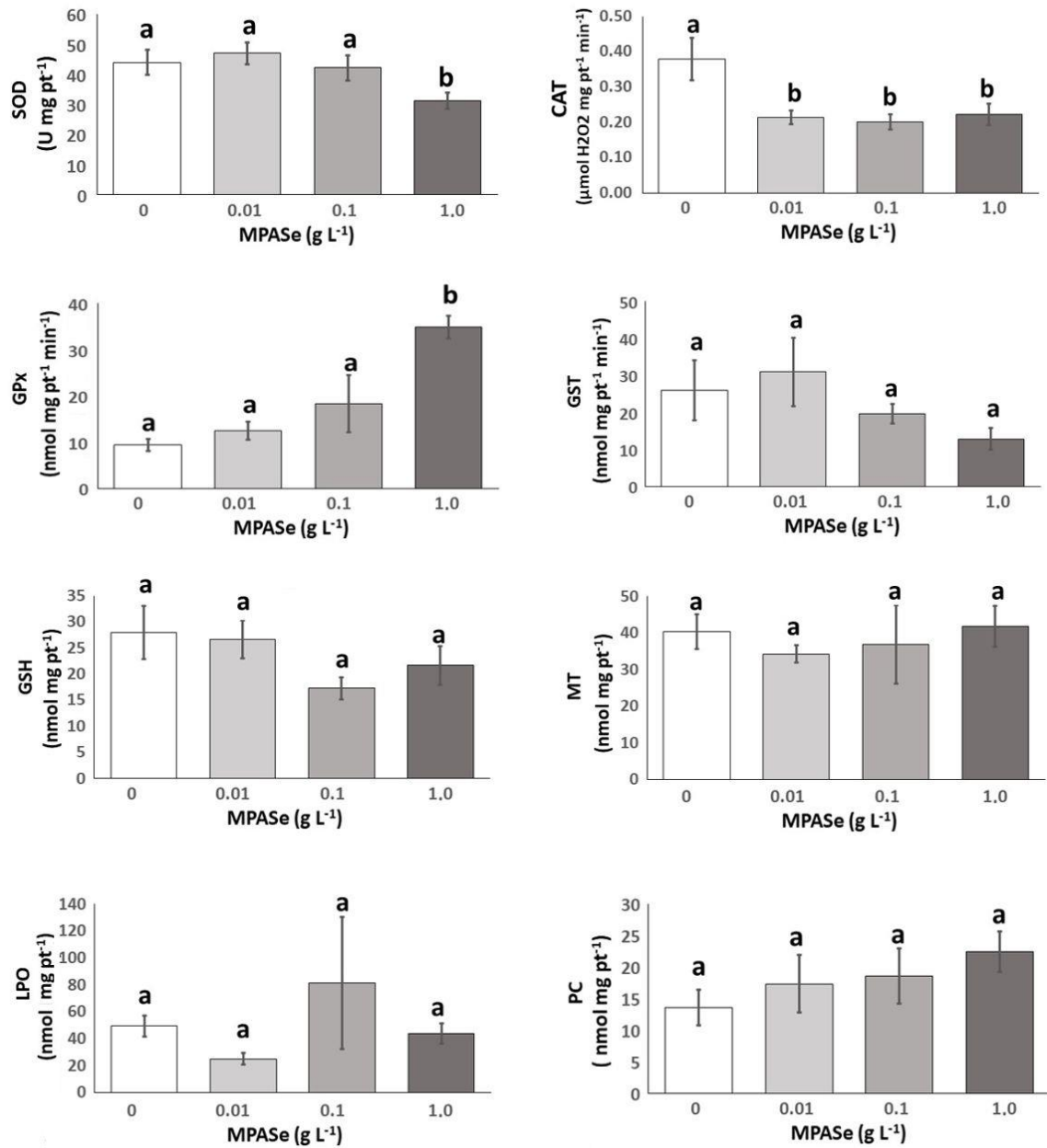


Figura 8. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona peroxidase (GPx), nível de glutiona-S-transferase (GST), conteúdo de glutiona (GSH), metalotioneína (MT), nível de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC) de hepatopâncreas de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios \pm erro padrão erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$).

5,2,3 Rins

Nos rins, a atividade da SOD e GPx não mostraram alterações significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). A atividade da CAT aumentou 197 % no tratamento de 1 g L^{-1} em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto o nível de GSH teve um aumento entre 327 e 389 % nos tratamentos 0,1 e 1 g L^{-1} em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 9).

A GST mostrou um aumento de 371 % no tratamento 1 g L^{-1} quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 9) e o nível de LPO não teve alteração entre os tratamentos ($p > 0,05$).

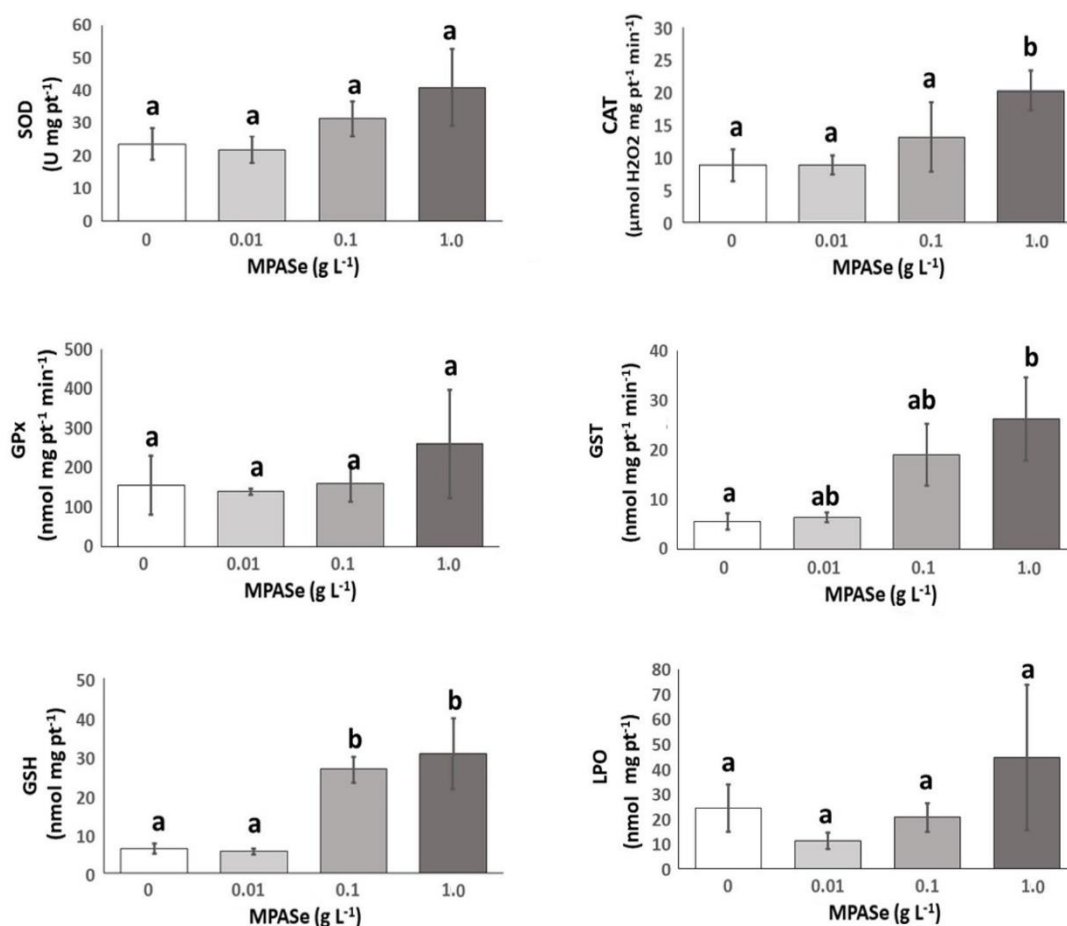


Figura 9. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), nível de glutaciona-S-transferase (GST), conteúdo de glutaciona (GSH) e nível de peroxidação lipídica (LPO) nos rins de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por

96 horas. Valores médios \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$).

5.2.4 Músculo branco

No músculo branco, a atividade da CAT e conteúdo de GSH não apresentaram alterações significativas nos diferentes tratamentos em relação ao controle ($p > 0,05$). Entretanto, o nível de GST teve aumento significativo de 150% e 140% nos tratamentos 0,01 e 0,1 g L^{-1} MPASe, respectivamente ($p < 0,05$). O nível de LPO aumentou 53,33% no tratamento 0,01 g L^{-1} ($p < 0,05$) e PC não apresentou alterações ($p > 0,05$) (Figura 10),

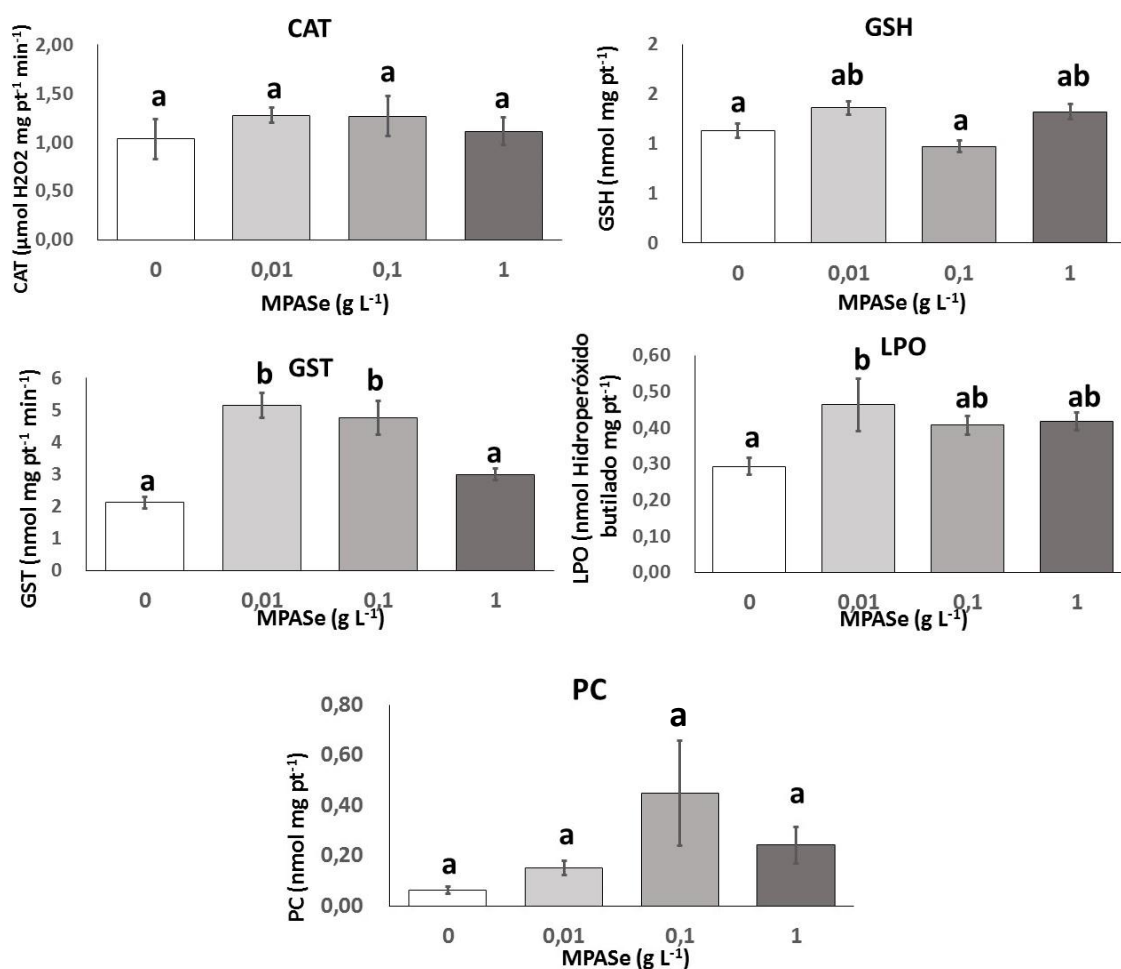


Figura 10. Atividade da enzima catalase (CAT), nível de glutatona-S-transferase (GST), nível de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC) de músculo branco de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por 96 horas. Valores médios \pm erro padrão. Letras

diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$).

5.2.5 Músculo vermelho

No músculo vermelho, a atividade da CAT, nível de GST e conteúdo de GSH não apresentaram alterações quando comparados ao controle ($p > 0,05$). Entretanto, o nível de LPO apresentou alterações significativas no tratamento exposto a $0,1 \text{ g L}^{-1}$, tendo uma porcentagem de aumento de 40% ($p < 0,05$). Enquanto o nível de proteínas carboniladas aumentaram significativamente em todos os tratamentos de exposição ao MPASe, tendo um aumento de 10%, 60% e 50%, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 11).

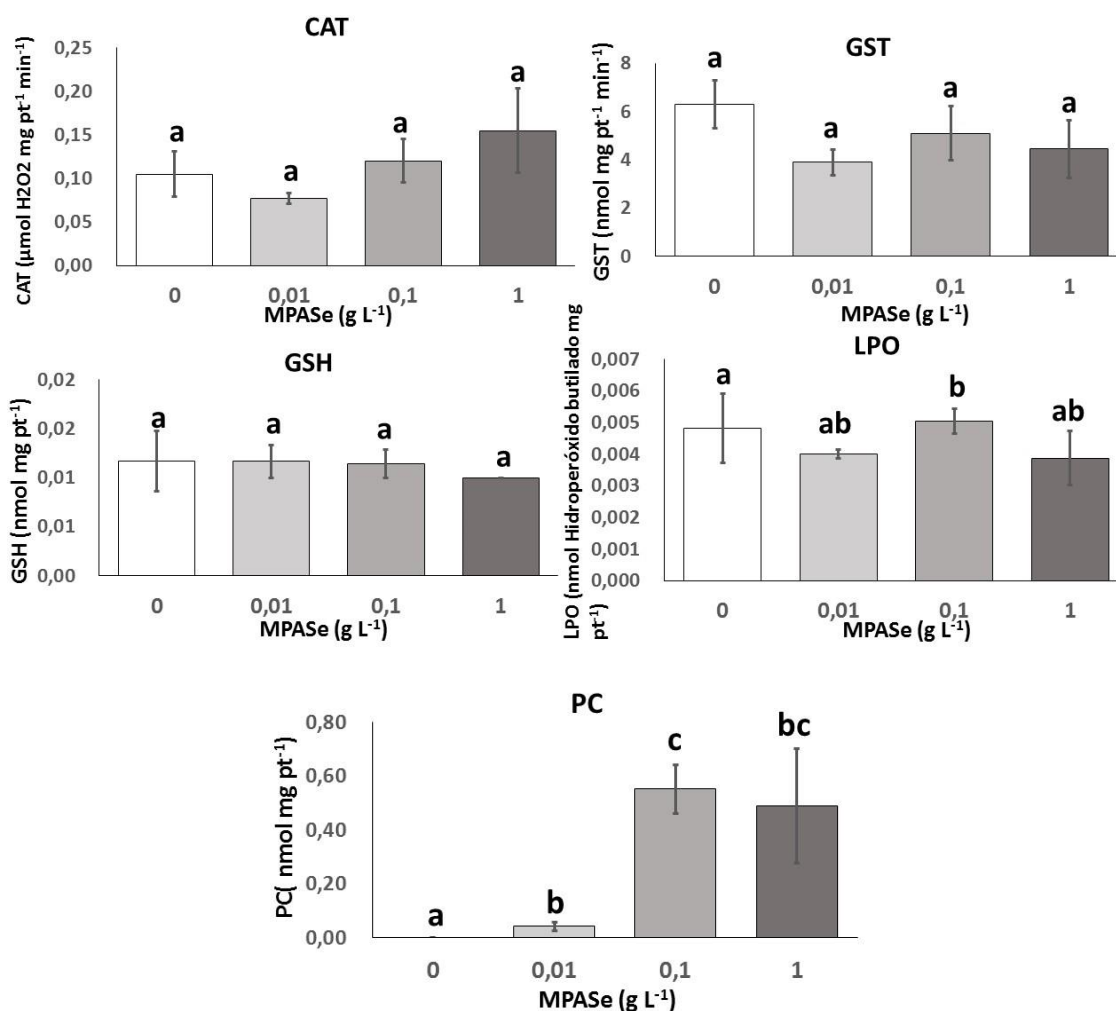


Figura 11. Atividade da enzima catalase (CAT), nível de glutatona-S-transferase (GST), conteúdo de glutatona (GSH), nível de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC) de músculo vermelho de *Centropomus parallelus* expostos a concentrações crescentes de material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) por

96 horas. Valores médios \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$).

5.3 Análise de Correlação de Spearman

Nas tabelas 12 a 16 foram apresentados os resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis biológicas (biomarcadores) e as variáveis químicas (análise multielementar para uma compreensão pontual de causa/efeito entre a variação observada em determinado(s) biomarcador(es) e o(s) provável(eis) elemento(s) químico(s) responsável(eis) por este efeito. Foram reportados os coeficientes (r_s) acima de 0,50 com $p < 0,05$.

5.3.1 Brânquias

A tabela 12 mostra as correlações significativas nas brânquias. As correlações entre variáveis químicas e biológicas apresentam significância entre a GST e os elementos Se e Rb, entre a GPx e o Ti e, entre a SOD com elementos Ti, Fe, Sr e La. As correlações entre as variáveis biológicas apresentaram significância entre a GST e GPx, e entre IAH e SOD.

Tabela 12. Valores significativos de brânquias obtidos através da análise de correlação de Spearman.

Brânquias	
Variáveis Químicas/Biológicas	Variáveis Biológicas/Biológicas
GST: Se ($r_s = 0,58$) and Rb ($r_s = 0,70$)	GST and GPx ($r_s = 0,59$)
GPx: Ti ($r_s = -0,52$)	IAH and SOD ($r_s = -0,81$)
SOD: Ti ($r_s = -0,65$), Fe56 ($r_s = -0,50$), Fe57 ($r_s = -0,51$), Sr ($r_s = -0,60$), La ($r_s = -0,56$)	

5.3.2 Hepatopâncreas

A tabela 13 indica as correlações significativas em hepatopâncreas. As correlações entre variáveis químicas e biológicas foram significativas entre a GST e V e Fe, GPx e Se, PC e os elementos Cr, Ni, Cd, Hg, entre a MT e elementos Ni, As, Rb e Hg e, entre IAH e Fe. Enquanto a correlação entre variáveis biológicas foi significativa entre GSH e MT e entre GSH e SOD.

Tabela 13. Valores significativos de hepatopâncreas obtidos através da análise de correlação de Spearman.

Hepatopâncreas	
Variáveis Químicas/Biológicas	Variáveis Biológicas/Biológicas
GST: V ($r_s = -0,53$) and Fe56 ($r_s = -0,56$) GPx: Se ($r_s = 0,54$)	GSH and MT ($r_s = 0,50$)
PC: Cr ($r_s = -0,76$), Fe56 ($r_s = -0,63$), Ni ($r_s = -0,76$), Cd ($r_s = -0,51$), Hg201 ($r_s = -0,51$), Hg202 ($r_s = -0,61$)	GPx and SOD ($r_s = -0,51$)
MT: Ni ($r_s = -0,53$), As ($r_s = -0,56$), Rb ($r_s = -0,59$), Hg202 ($r_s = -0,61$)	
IAH: Fe56 ($r_s = 0,53$)	

5.3.3 Rins

A tabela 14 apresenta correlações significativas dos rins. As correlações significativas entre as variáveis químicas e biológicas foram entre GSH e Se, SOD e Cr e Ni e, IAH e os elementos Ce e Hg. Entre as variáveis biológicas, a correlação da CAT e GPx e LPO, GSH e GPx, SOD e LPO foram significativas.

Tabela 14. Valores significativos de rins obtidos através da análise de correlação de Spearman.

Rins	
Variáveis Químicas/Biológicas	Variáveis Biológicas/Biológicas
GSH: Se ($r_s = -0,53$)	CAT: GPx ($r_s = 0,62$) and LPO ($r_s = 0,63$)

SOD: Cr ($r_s = 0,65$), Ni ($r_s = 0,57$)	GSH: GPx ($r_s = 0,61$), SOD ($r_s = 0,61$) and LPO ($r_s = 0,56$)
IAH: Ce ($r_s = -0,56$), Hg202 ($r_s = -0,52$)	GPx: SOD ($r_s = 0,72$) and LPO ($r_s = 0,84$)
	LPO: SOD ($r_s = 0,52$)

5.3.4 Músculo branco

A tabela 15 indica correlações significativas no músculo branco. Entre variáveis químicas e biológicas foram significativas a GSH e elementos Fe e Ni, GST e Hg e, PC e Cr. Entre as variáveis biológicas foram significativos a CAT e GST, GST e LPO e, PC e LPO.

Tabela 15. Valores significativos de músculo branco obtidos através da análise de correlação de Spearman.

Músculo Branco	
Variáveis Químicas/Biológicas	Variáveis Biológicas/Biológicas
GSH: Fe57 ($r_s = -0,52$) and Ni ($r_s = -0,66$)	CAT and GST: ($r_s = 0,55$)
GST: Hg202 ($r_s = -0,66$)	GST and LPO: ($r_s = 0,64$)
PC: Cr ($r_s = 0,55$)	PC and LPO: ($r_s = 0,53$)

5.3.5 Músculo vermelho

A tabela 16 indica as correlações significativas do músculo vermelho. As correlações significativas entre as variáveis químicas e biológicas são PC e Cr, e entre variáveis biológicas CAT e PC, e GST e LPO foram significativas.

Tabela 16. Valores significativos de músculo vermelho obtidos através da análise de correlação de Spearman.

Músculo Vermelho	
Variáveis Químicas/Biológicas	Variáveis Biológicas/Biológicas
PC: Cr ($r_s = 0,67$)	CAT and PC: ($r_s = 0,54$)
	GST and LPO: ($r_s = 0,51$)

5.4 Biomarcadores morfológicos

5.4.1 Brânquias

A morfologia geral dos filamentos e lamelas branquiais de *C. parallelus* é semelhante à de outros teleósteos. O epitélio do filamento é estratificado, a camada de células em contato com o meio externo é constituída por células pavimentosas, células mucosas que protegem o epitélio, principalmente quando expostos a condições que podem causar malefícios, e ionócitos que são células que estão relacionadas a troca de íons entre o meio externo e interno do animal. O epitélio lamelar é constituído por duas camadas de células epiteliais revestindo as células pilares. Observou-se algumas alterações nas células do epitélio branquial dos animais do grupo controle, como hiperplasia do epitélio lamelar e do epitélio do filamento (Figura 12.A). Não se observou edemas, hipertrofia de ionócitos, aumento do espaço intersticial entre as células do epitélio do filamento e lamelar, constrição e rupturas de células pilares em nenhuma concentração (Tabela 17).

Após a exposição de *C. parallelus* ao MPASe por 96 horas, houve uma frequência maior de lesões nos animais expostos a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de MPASe. Dentre as lesões, as mais frequentes nos animais expostos foram a hiperplasia do epitélio do filamento, fusão parcial de duas ou mais lamelas. Houve também hiperplasia do epitélio lamelar, dilatação de espaços capilares, constrição sanguínea e ruptura epitelial (Figura 12.B, C e D). Lesões como hipertrofia de ionócitos, aumento intersticial do epitélio, constrição e ruptura de células pilares não foram registrados nos animais em nenhuma concentração (Tabela 17).

Apesar dos índices individuais serem baixos, houve comprometimento morfofuncional do órgão, principalmente em brânquias expostas a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ MPASe, como representada na Figura 13.

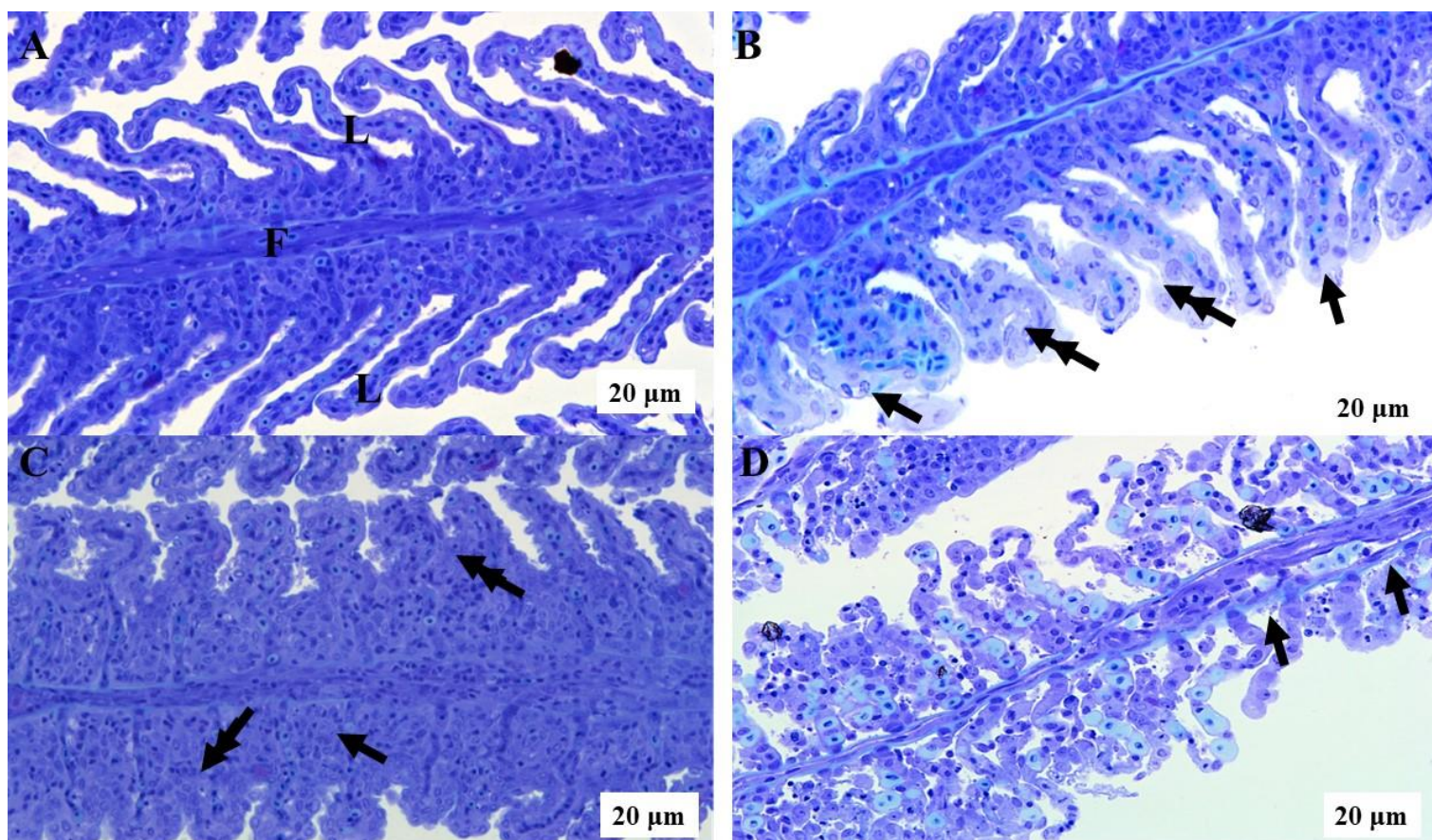


Figura 12. Histologia branquial de *C. parallelus*, **A.** Grupo controle (0 g L^{-1} MPASe), estruturas apresentando características normais da lamela (L), filamento (F). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. Histopatologia branquial em *C. parallelus* após a exposição ao MPASe por 96 horas. **B.** Hiperplasia do epitélio lamelar (seta), deslocamento epitelial (seta dupla). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. **C.** Fusão parcial lamelar (seta dupla), hiperplasia do epitélio do filamento (seta). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. **D.** Dilatação dos espaços capilares (seta). Barra de escala: $20 \mu\text{m}$. Coloração: Azul de toluidina.

Tabela 17. Índice de cada lesão (I_L) registradas nas brânquias de *C. parallelus* após exposição ao MPASe.

Lesões histológicas	$0,0 \text{ g L}^{-1}$	$0,01 \text{ g L}^{-1}$	$0,1 \text{ g L}^{-1}$	1 g L^{-1}
Hiperplasia do epitélio do filamento	0,25	0,65	1,24	0,99

Fusão total de 2 ou + lamelas	0,17	0,22	0,55	0,21
Fusão parcial de 2 ou + lamelas	0,5	0,61	1,50	0,90
Deslocamento do epitélio lamelar	0,05	0,17	0,32	0,60
Edema	0	0,02	0	0,15
Congestão/Hiperemia lamelar	0	0,05	0,10	0,04
Dilatação canal marginal	0	0,02	0	0
Hiperplasia/Proliferação de ionócitos	0	0	0,25	0
Hipertrofia de células mucosas	0	0	0	0,02
Hiperplasia/Proliferação de células mucosas	0	0	0,1	0,21
Enrolamento lamelar apical	0	0,37	0,5	0,62
Atrofia do epitélio lamelar	0	0	0,05	0
Hiperplasia do epitélio lamelar	0,92	0,9	1,28	0,99
Ruptura do epitélio lamelar	0	0	0,1	0,04
Aneurisma lamelar	0,02	0,02	0,17	0,06
Aneurisma apical (canal marginal)	0	0,07	0,2	0
Necrose	0	0	0,21	0
Fibrose	0	0	0,05	0

Extensão da lesão: 0. Ausência de lesão (0-10%); 1. Lesão raramente presente (10-25%); 2. Lesão moderadamente frequente (25 a 50%); 3. Lesão frequente (50-75%) e 4. Lesão altamente frequente (75 a 100%). Fator de importância: 1 (azul) Lesão reversível com pouca importância; 2. Lesão reversível após remoção do agente estressor e moderada importância patológica e, 3. Lesão irreversível com alta importância patológica.

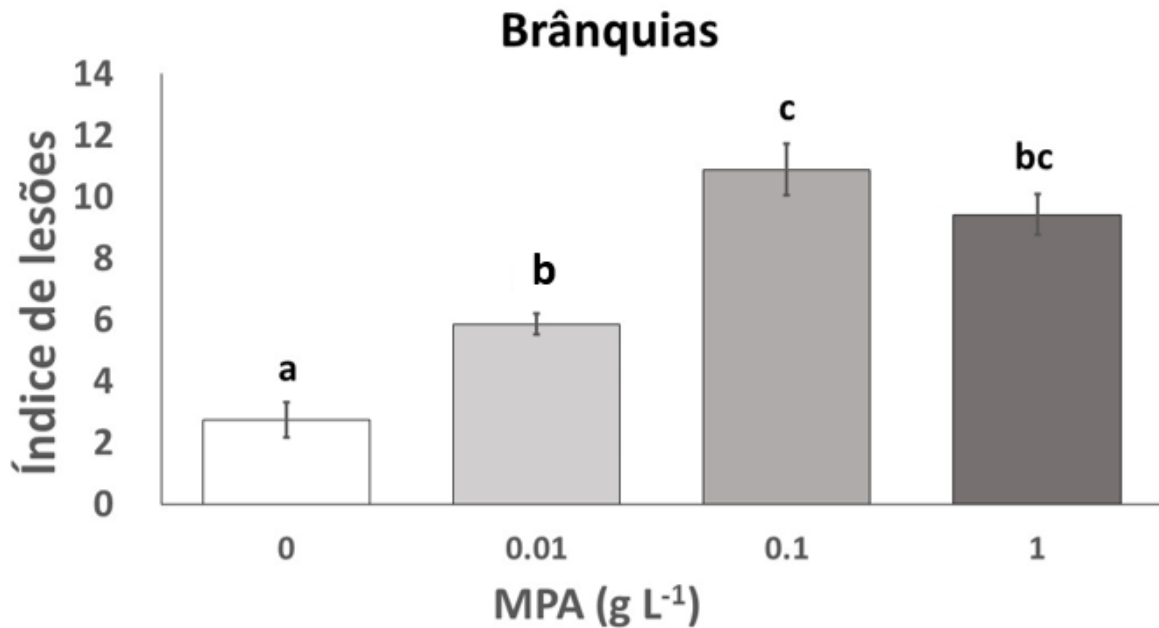


Figura 13. Índice de lesões nas brânquias ($I_{Lbrânquias}$) de *C. parallelus* após exposição ao MPASe. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

5.4.2 Hepatopâncreas

No hepatopâncreas, os cordões de hepatócitos estão organizados como no fígado dos demais peixes e entre o tecido hepáticos há a inclusão de tecido pancreáticos. Nos animais do grupo controle foram mais observadas alterações celulares não identificadas (Figura 14 A, B; Tabela 18).

Após a exposição ao MPASe, observou-se uma frequência maior das lesões nos animais expostos a 1 g L⁻¹ de MPASe, com registros de alterações estruturais no parênquima e hipertrofia dos hepatócitos. Entretanto, não se observou nos animais expostos lesões consideradas graves e irreversíveis (Tabela 18).

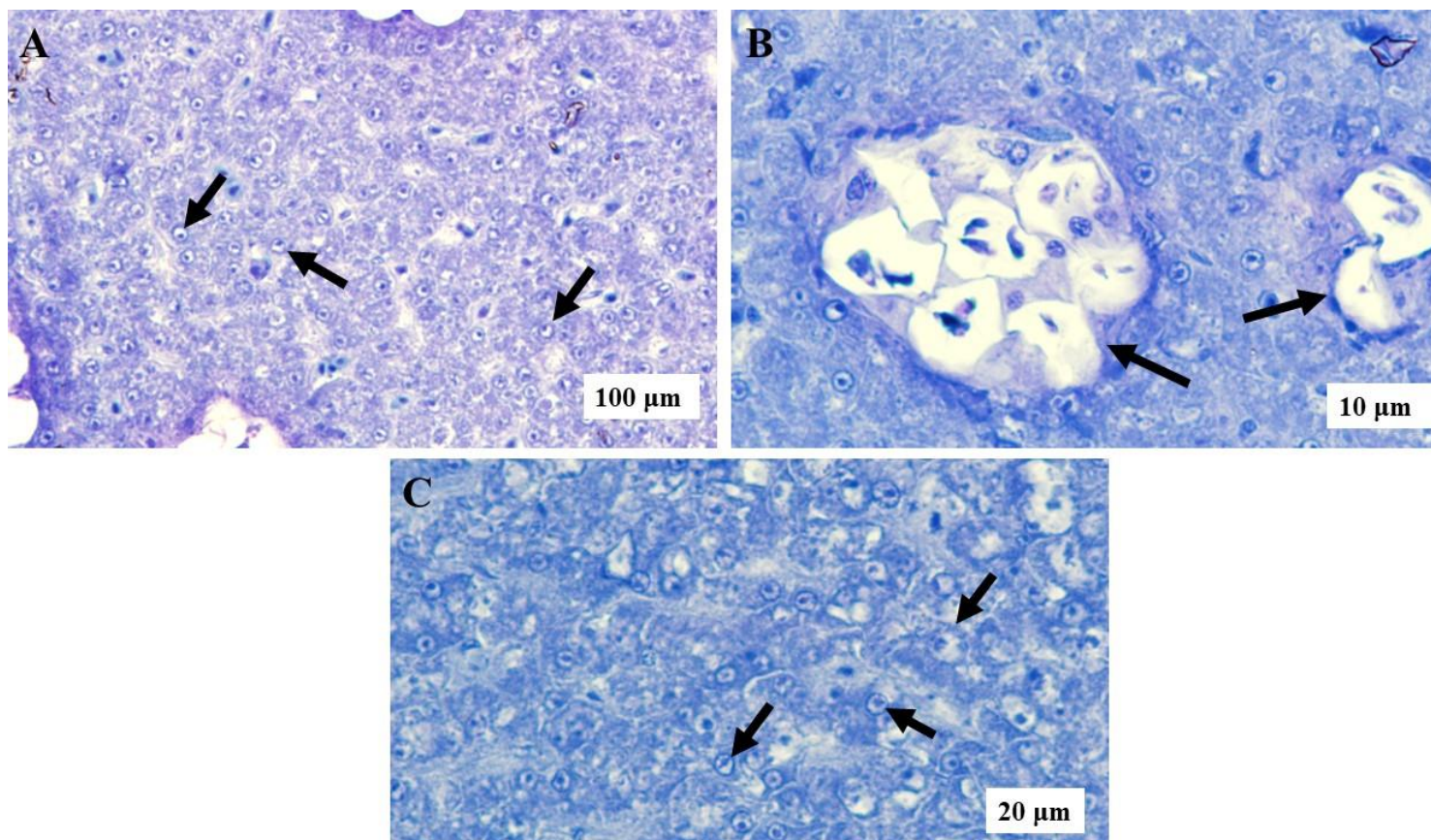


Figura 14. Histologia de hepatopâncreas de *C. parallelus*. **A.** Grupo controle, (0 g L^{-1} MPASe), estruturas apresentando características normais com hepatócitos normais com núcleos (setas). Barra de escala: $20 \text{ }\mu\text{m}$; **B.** Alterações não identificadas (seta) Barra de escala: $20 \text{ }\mu\text{m}$; **C.** Hipetrofia nuclear (setas). Barra de escala: $20 \text{ }\mu\text{m}$. Coloração Azul de toluidina e fucsina básica.

Tabela 18. Índice de cada lesão (I_L) registradas nos hepatopâncreas de *C. parallelus* após exposição ao MPASe.

Lesões Histológicas	0,0 g L ⁻¹	0,01 g L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	1 g L ⁻¹
Congestão/dilatação do sinusóides na circulação	0	0,28	0,28	0,11
Alterações estruturais e na arquitetura do parênquima	0	0	0	1,09
Hipertrofia nos hepatócitos	0	0	0	1,10
Depósitos intracelulares nos hepatócitos	0,02	0	0	0
Acúmulo de lipídeos nos hepatócitos	0,05	0	0	0
Glicogênio nos hepatócitos	0	0	0	0,14
Alterações celulares não identificadas	0,65	0,10	0,3	0,3
Hipertrofia dos núcleos	0,10	0	0	0
Degeneração nuclear	0,05	0	0	0
Necrose hepatócitos	0,02	0	0	0

Extensão da lesão: 0. Ausência de lesão (0-10%); 1. Lesão raramente presente (10-25%); 2. Lesão moderadamente frequente (25 a 50%); 3. Lesão frequente (50-75%) e 4. Lesão altamente frequente (75 a 100%). Fator de importância: 1 (azul) Lesão reversível com pouca importância; 2. Lesão reversível após remoção do agente estressor e moderada importância patológica e, 3. Lesão irreversível com alta importância patológica.

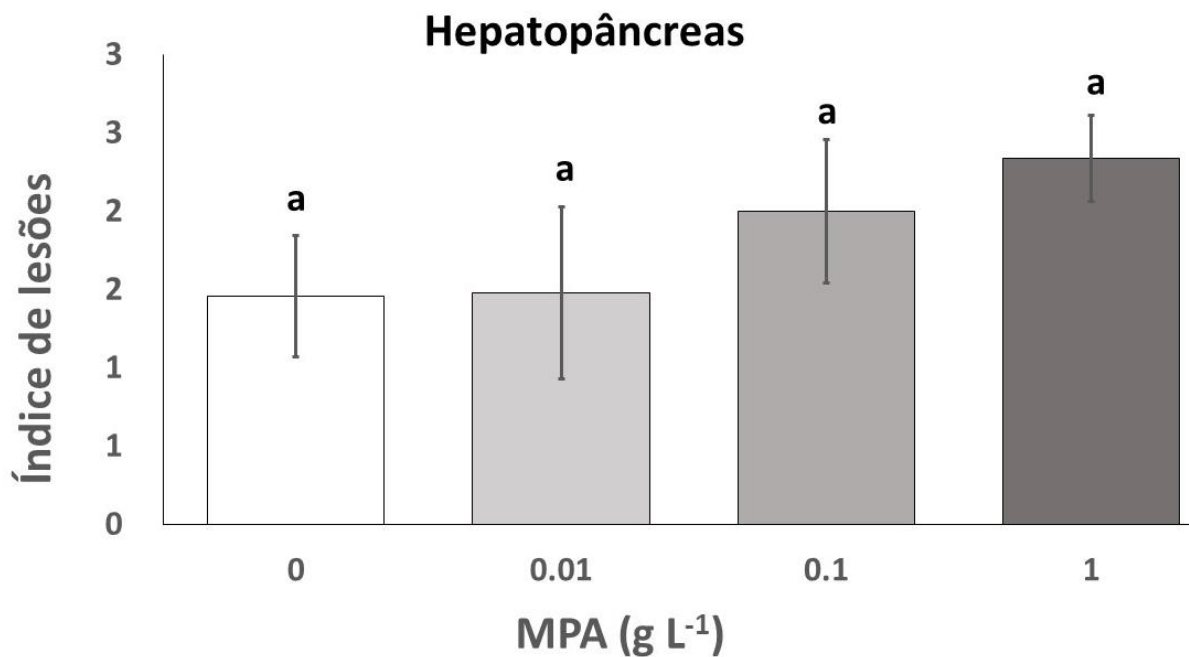


Figura 15. Índice de lesões ($I_{L_{hepatopâncreas}}$) registradas em hepatopâncreas de *C. parallelus* antes e após exposição ao MPASe. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

5.3.3 Rins

Nos rins do grupo controle (Figura 16,A), observou-se algumas patologias reversíveis, dentre elas a hipertrofia nuclear, melanomacrófagos e depósitos intracelulares, entretanto patologias reversíveis moderadas e irreversíveis não foram constatadas, como indica a Tabela 19.

Após a exposição dos animais ao MPASe, a frequência de patologias apresentou uma frequência maior, principalmente em animais expostos a 0,1 g L⁻¹ de MPASe. Dentre elas está a hipertrofia nuclear e celular (Figura 16.B). Não foram observadas lesões reversíveis moderadas e irreversíveis em nenhum tratamento (Tabela 19).

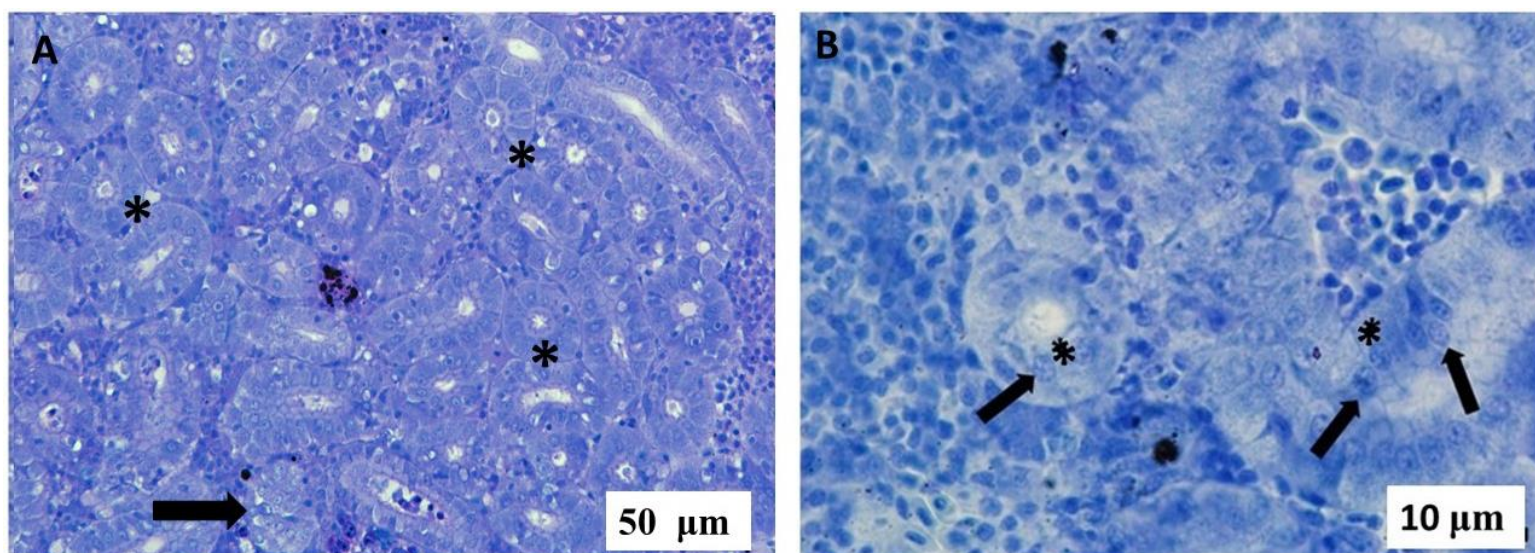


Figura 16. Histologia renal de *C. parallelus*, **A.** Estrutura morfológica normal de rins com glomérulos (seta); túbulos renais (*). Barra de escala: 50 μm. Histopatologia renal em *C. parallelus* após exposição ao MPASe. **B.** Hipertrofia celular (*); hipertrofia nuclear (seta) Barra de escala: 10 μm, Coloração: Azul de toluidina e fuscina básica.

Tabela 19. Lesões morfológicas registradas nos rins de *C. parallelus* após a exposição ao MPASe.

Lesões morfológicas	0,0 g L ⁻¹	0,01 g L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	1 g L ⁻¹
Redução glomerular	0	0,03	0,72	0,5
Depósitos intracelulares	1,12	0	0,12	0
Vacuolização intracelular	0,	0	0	0
Hipertrofia	0,25	0	0	0
Dilatação da capsula de Bowman	0	0	0,07	0
Macrófagos/ Melanomacrófagos	0 6,37	0,62 4,37	0 6,06	0,37 4,25

Alterações estruturais e arquitetura	0	2,0	1,62	1,25
Hipertrofia celular	1,0	5,12	5,79	5,0
Hipertrofia nuclear	2,25	5,37	5,54	5,12

Extensão da lesão: 0. Ausência de lesão (0-10%); 1. Lesão raramente presente (10-25%); 2. Lesão moderadamente frequente (25 a 50%); 3. Lesão frequente (50-75%) e 4. Lesão altamente frequente (75 a 100%). Fator de importância: 1 (azul) Lesão reversível com pouca importância; 2. Lesão reversível após remoção do agente estressor e moderada importância patológica e, 3. Lesão irreversível com alta importância patológica.

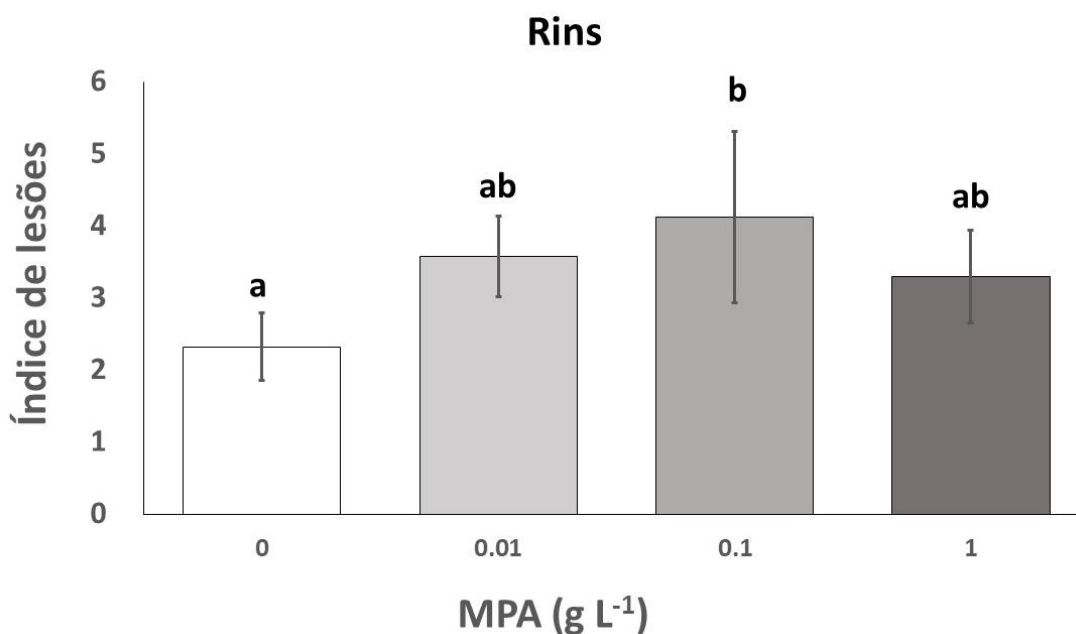


Figura 17. Índice de lesões (I_{Lrins}) registradas em rins de *C. parallelus* antes e após exposição ao MPASe. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização e bioconcentração do MPASe

Nos últimos anos, tem se observado uma crescente preocupação com os efeitos causados nos organismos associados aos metais no ambiente (Shahjahan et al., 2022). O uso de testes de toxicidade tem sido utilizado para determinar as concentrações letais e, utilizando exposições subletais, é usado para investigar os efeitos dos metais nos processos bioquímicos e fisiológicos e alterações morfológicas dos animais auxiliando a determinar qual o limite desses elementos em ambiente natural (Shahjahan et al., 2022).

Há uma sedimentação do material particulado quando o MPASe é depositado no ambiente aquático, entretanto parte dele permanece biodisponível na água. Fortes (2021) analisando a dinâmica do MPASe em água doce mostrou que somente 1 a 10% do MPASe é dissolvido, o restante é sedimentado. Estudos de Souza e colaboradores (2021 a) envolvendo microscopia eletrônica de transmissão, difração de raio-X e análise química com ICP-MS analisou física e quimicamente a constituição do MPASe da mesma região. Através destes estudos foi apresentado que este material é composto principalmente por Fe, Al, Mn e Ti, assim como no presente estudo. As concentrações mais altas de metais no MPASe foram para elementos Fe e Al, concentrações de Ti, Mn e Zn foram muito próximas a 200 e 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ e, V, Cr, Ni, Cu, Rb, Sr, Y, Zr, Sn, Ba, Ce e Pb são encontrados em concentrações mais baixas. Além deste estudo, Soares e colaboradores (2022) também quantificaram metais presentes no MPASe da mesma área afetada pela siderurgia e os valores obtidos foram semelhantes, com concentrações altas de Fe e Al, e mais baixas de Ti e Mn. Esses autores relataram efeitos subletais nos peixes expostos a 1 g L^{-1} de MPASe.

Os órgãos estudados no presente estudo apresentaram bioconcentração de alguns metais, principalmente de Fe, Al e Zn. A concentração de metais em organismos

aquáticos pode variar de acordo com a espécie, idade, alimentação, comportamento, teor lipídico e até nível trófico do organismo, além de outras variáveis do ambiente em que o animal se encontra, como salinidade, temperatura, variações sazonais e outros fatores (Voigt, et al., 2016; Shahjahan et al., 2022). Matos (2021) determinou as concentrações de Al, Ba, Cr, Fe, Mn, Se e Zn em brânquias e tecido muscular de peixes do rio Doce após quatro anos do rompimento de barragem e constatou que todos os elementos estavam acima dos valores máximos permitidos nas brânquias segundo a resolução RDC N° 42 (ANVISA, 2013), com valores superiores para Fe, Al e Zn, corroborando com a quantificação de metais do presente estudo.

O comportamento dos metais no metabolismo dos organismos os classifica como essenciais ou não essenciais. Os elementos essenciais são aqueles no qual os organismos necessitam para a atividade metabólica e, de acordo com as concentrações necessárias podem ser considerados macroelementos como o Ca, Mg, K, e o Na e, microelementos como o Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Sn, Cr. Os elementos essenciais pode ser tóxicos se estiverem em alta concentração no organismo. Elementos não essenciais não fazem parte dos processos bioquímicos e fisiológicos gerando um efeito deletério aos organismos, mesmo em baixas concentrações (Moschem e Gonçalves, 2020). Tendo em vista a crescente comercialização de pescados no Brasil, é importante salientar que a ausência ou falta de biomonitoramento destes elementos no ambiente aquático pode ocasionar efeitos deletérios à saúde, visto que é necessário avaliar o nível de vulnerabilidade da população e dos demais organismos.

Muitas pesquisas mostram a bioacumulação/bioconcentração de metais pesados em órgãos de peixes (Voigt et al., 2016; Ferreira, 2020; Vicente et al., 2021) e outros organismos aquáticos como crustáceos (Piassão et al., 2019; Jesus et al., 2020), insetos aquáticos (Menegat et al., 2020) e macrófita aquática (De Lima et al., 2022). Há diversos

registros de bioacumulação/bioconcentração em brânquias, fígado, rins e músculos de peixes (Voigt et al., 2016; Souza et al., 2018 a; Gabriel et al., 2020; Matos, 2021). As brânquias realizam trocas gasosas e são consideradas o primeiro órgão em contato com a água e, dessa forma, metais e partículas metálicas dissolvidas ou suspensas na água podem ser absorvidas pela superfície branquial ocorrendo a contaminação do organismo. Os metais podem acumular nas brânquias ou serem transferidos para a corrente sanguínea e se acumularem em outros órgãos, especialmente no hepatopâncreas e rins – que são os órgãos responsáveis pela detoxificação de xenobióticos como os metais (Carvalho et al., 2022).

O fígado é um órgão constituído principalmente por hepatócitos em que uma das funções é participar do processo de detoxificação de xenobióticos, metabolizando-os. Ele é um dos primeiros órgãos a agir contra os metais que interferem no metabolismo do animal, possuem alta capacidade de bioacumular os metais no seu interior e, por isso é considerado um dos órgãos-alvo para estudos de toxicidade. Os metais podem ser acumulados nas células hepáticas impedindo as mesmas de exercer o seu papel fisiológico. Por essa razão, as alterações causadas pelos metais podem indicar uma resposta tóxica no órgão a depender do tempo que o animal foi exposto e a concentração desses metais. O mesmo ocorre nos rins, que também é considerado um indicador de toxicidade devido as respostas rápidas do órgão com a exposição a xenobióticos, incluindo as partículas metálicas. Os rins são órgãos responsáveis por parte da homeostase osmótica dos peixes e excreção de xenobióticos, por essa razão podem sofrer grandes impactos com o acúmulo dessas partículas (Jiang et al., 2017). Segundo a análise de correlação de Spearman, houve uma correlação significativa entre o elemento Fe e as alterações histológicas de hepatopâncreas. Esse fato é comumente relatado em outros estudos, como por exemplo o estudo de El-Naggar e colaboradores (2009) que relataram

que em espécies de peixes do rio Nilo o acúmulo de Fe foi um dos responsáveis por alterações patológicas nos fígados dos peixes.

Já o tecido muscular é considerado bom indicador de toxicidade para exposições longas na qual a exposição do xenobiótico ultrapassa os limites de defesa dos organismos, bioacumulando e afetando o metabolismo do animal (Monferran et al., 2016). Esse acúmulo de metais nos tecidos musculares dos peixes gera preocupação, uma vez que é a parte do peixe consumida pelos humanos, de forma a se constituir em uma contaminação indireta, via cadeia trófica.

Os resultados obtidos indicam que a ordem de maior bioconcentração dos metais foi hepatopâncreas > rins > brânquias > músculos. Hepatopâncreas e rins tiveram os maiores níveis de acumulação de metais, provavelmente por serem os órgãos mais ativos no processo de armazenamento e desintoxicação como já enfatizado por Malik et al. (2010). Malik e colaboradores (2010) ao analisar a acumulação de chumbo, cádmio, zinco, níquel, cobre, crômio e mercúrio em espécies de peixes *Labeo rohita* e *Ctenopharyngodon idella* do lago superior de Bhopal em amostras de brânquias, fígado, rim e músculos verificaram que ambas as espécies apresentaram menor acumulação de metais nos músculos. A menor acumulação no musculo estavam dentro do valor padrão máximo permitido e, não constituíam risco à saúde humana caso estas espécies sejam consumidas.

6.2 Biomarcadores bioquímicos em órgãos de *C. parallelus*

A presença de metais nos organismos pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres nas células. Para neutralizar esses radicais livres, as células

possuem um sistema antioxidante constituído por enzimas e moléculas antioxidantes que são capazes de transformá-los ou eliminá-los (Barreiros et al., 2006).

Nas brânquias, a diminuição da atividade da SOD pode estar relacionada a maior bioconcentração de metais após exposição a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ MPASe de forma que a não alteração na atividade da CAT e GPx sugere que não houve ativação desse sistema de defesa antioxidante. Da mesma forma, a não alteração da atividade de GST e nível de GSH sugere que a rota de biotransformação de fase II não foi ativada para facilitar a excreção. Embora metais podem ser complexados com a GSH e MT, diferentemente de contaminantes orgânicos, os metais podem ser transformados por redução e metilação ou enzimas específicas, podendo se tornar mais ou menos tóxico (Wood, 2011).

Em geral, metais e outras substâncias absorvidas pelas brânquias podem se acumular/concentrar nesses órgãos ou ser transferidas para o sangue e transportadas para outros órgãos (Paulino et al., 2012). De forma geral, esse fato, faz com que a acumulação/concentração de metais nas brânquias, possa ser menor do que em hepatopâncreas. Embora alguns metais foram concentrados em valores altos após exposição a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ MPASe, os valores de bioconcentração em peixes expostos a 1 g L^{-1} MPASe foi menor, o que sugere possível transferência para o sangue. Outra hipótese, foi postulada por Jin et al. (2010) e corroborada por Paulino et al. (2012) de que as brânquias apresentam menor sensibilidade a muitos xenobióticos e, conseqüentemente, baixa resposta das enzimas antioxidantes. Entretanto, a correlação negativa entre a atividade da SOD e os metais Fe, Ti, Sr e La sugere que o aumento desses metais no tecido branquial após exposição ao MPASe colaborou para a inibição dessa enzima. De forma geral, a correlação negativa SOD-Fe indica que a depender da concentração e acumulação no órgão, esse metal pode exercer um efeito tóxico, mesmo sendo um elemento essencial para o organismo. GPx e GST também evidenciaram correlação

negativa com Ti, Se, respectivamente, sugerindo que o aumento desses metais pode influenciar a atividade dessas enzimas.

Em relação ao hepatopâncreas, a bioconcentração foi mais alta do que nos demais órgãos (brânquias, rins e músculos), principalmente Fe e Al, como esperado uma vez que o fígado é o principal órgão de detoxificação no organismo. Além disso Mo, Cd, e Hg foram bioconcentrados apenas no hepatopâncreas. A inibição da SOD após exposição de *C. parallelus* a 1 g L^{-1} de MPASe e a não correlação com o Fe como ocorreu nas brânquias, embora a concentração de Fe no hepatopâncreas foi muito mais alta, pode estar associada aos mecanismos de regulação intracelular de Fe envolvendo proteínas reguladoras do ferro (Grotto, 2008). Nos mamíferos, o Fe é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado entretanto, o excesso de Fe livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas e lesam proteínas, lipídios e DNA (Grotto, 2008). A não ativação da SOD explica, até certo ponto, a redução da atividade da CAT, uma vez que essa enzima degrada o H_2O_2 produzido pela SOD. No entanto, o aumento da atividade da GPx no tratamento com maior exposição ao MPASe sugere que a eliminação de peróxidos ocorreu parcialmente via glutathione peroxidase. A GPx é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e não orgânicos (Lesser, 2006), portanto o aumento da atividade da GPx nos animais expostos a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ MPASe deve-se provavelmente ao aumento de outros peróxidos que não o H_2O_2 . A correlação de Spearman indicou significância positiva entre a atividade da GPx e Se, e negativa com a SOD que é a enzima que desempenha uma ação catalítica sobre o radical ânion superóxido e teve sua atividade diminuída ao ser exposta a 1 g L^{-1} MPASe (Schvezov et al., 2022).

Nos rins, a atividade enzimática da CAT nos animais expostos mostra que houve formação de H_2O_2 nas células e ativação da enzima para neutralizá-la. Embora a SOD

não tenha aumentado significativamente, ela pode ter contribuído para o aumento da produção de H_2O_2 e da atividade da CAT. Além disso, nos rins também houve o aumento da molécula antioxidante GSH e da atividade da enzima de biotransformação GST, sugerido que também houve indução da GST-GSH para eliminação de metais. A não alteração do nível de LPO nos diferentes tratamentos revela que as alterações no sistema antioxidante nesse órgão foram eficazes em degradar/eliminar as EROs produzidas pelos metais.

O músculo vermelho indicou alterações em dois marcadores bioquímicos. Uma delas foi o nível de proteínas carboniladas que segundo a correlação o elemento responsável por essa alteração foi o Cr, o acúmulo do metal gerando carbonilação de proteínas do músculo como já descrito por Mohanty e Samanta (2016). A segunda alteração foi aumento no nível de oxidação lipídica nos tratamentos expostos ao MPASe, A análise de correlação mostrou uma significância entre a GST com a LPO. A GST é uma enzima responsável por catalisar substratos tornando-os eletrofílicos utilizando a GSH. A redução de GSH pode reduzir a atividade da GST gerando estresse oxidativo como por exemplo, a oxidação lipídica (Hua Li et al., 2021).

O músculo branco, apresentou aumento significativo no tratamento exposto a 0,01 g L⁻¹ MPASe no nível de peroxidação lipídica. Estudos relatam que a toxicidade de misturas metálicas pode levar a oxidação de lipídios das células de diferentes órgãos, incluindo os músculos. Uma vez que as combinações metálicas podem gerar reações metabólicas nos organismos como a peroxidação lipídica (Waheed et al., 2014).

De modo geral, a atividade do sistema antioxidante apresentou alterações nas brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos mostrando que cada órgão responde de forma diferente, assim como a bioconcentração de metais que também difere em cada órgão. Fe e Zn foram os metais que mais bioconcentraram nos três órgãos e Sr teve maior

bioconcentração nos rins e brânquias, enquanto os marcadores bioquímicos mostram diminuição significativa na atividade da SOD das brânquias. No hepatopâncreas a SOD, CAT e GPx tiveram alterações significativas e, nos rins essa alteração ocorreu na CAT, GST e GSH. Essas diferenças já foram demonstradas por vários estudos com diferentes metais e outros contaminantes (Ruas et al., 2008, Souza et al., 2018 a). Souza e colaboradores (2018 a) pesquisando biomarcadores em peixes (*C. parallelus*) de dois estuários: baía de Vitória – com influência de indústrias siderúrgicas - e Santa Cruz – sem indústrias siderúrgicas -no ES, mostraram que a atividade da SOD no hepatopâncreas era inibida pela presença excessiva de Fe, Se, Zn, Mn e As. Além disso, esses mesmos elementos foram correlacionados com a inibição da atividade da CAT no mesmo órgão. Enquanto nos rins, Cr, Se, B e Cu foram correlacionados a alterações da GST e, nas brânquias a alteração do conteúdo de GSH foi correlacionado a presença de As, B, Se, Al e Mn.

Alguns dos dados apresentado por Souza et al. (2018 a) corroboram com o que foi observado no presente estudo, dentre elas a inibição da atividade da SOD nas brânquias associada ao Fe. Apesar do estudo de Souza et al. (2018 a) corroborar com o atual estudo, há muitas diferenças nos resultados obtidos e isso pode ser explicado por 3 hipóteses. A primeira, é que essa diferença pode ter acontecido pela disponibilidade dos metais nas baías, uma vez que a distribuição deles em ambiente natural difere de ambientes experimentais por consequência da área estabelecida nesses locais. A segunda hipótese, é que o MPASe em locais abertos pode sedimentar em áreas nos quais os peixes não passam tanto tempo da vida, e solubilizando menos nos lugares em que os peixes vivem. A terceira hipótese pode ser dada em relação a interação dos metais do MPASe com as variações do ambiente, especialmente pH. Castro et al. (2021) analisando a combinação de diferentes pH associados a metais em espermatozoides de *Colossoma macopomum*

(espécie amazônica) mostrou que em pH mais baixos (mais ácidos) tende a aumentar a peroxidação de lipídios o que pode ser considerado preocupante uma vez que a lipoperoxidação pode ocasionar o aumento da permeabilidade celular, danos no DNA e inativação de enzimas que podem afetar diretamente a reprodutividade desses organismos.

6.3 Biomarcadores morfológicos em órgãos de *C. parallelus*

A exposição de peixes a partículas metálicas em altas concentrações pode resultar numa interação desses xenobióticos com o meio intracelular e causar alterações histológicas nos tecidos, que podem ser reversíveis ou irreversíveis de acordo com a gravidade da lesão.

As lesões encontradas nas brânquias dos animais após a exposição ao MPASe indicam uma resposta de evitar a entrada de metais e partículas metálicas no organismo. A hiperplasia do epitélio lamelar e do filamento aumentam a distância entre a difusão água-sangue o possivelmente diminui a entrada desses xenobióticos no meio intracelular. Carmo e colaboradores (2018) também relatam essa resposta do epitélio branquial de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de dióxido de titânio (TiO₂).

De acordo com a classificação das alterações histopatológicas descritas em Cerqueira e Fernandes (2002), a maioria das lesões branquiais dos animais expostos ao MPASe não foram caracterizadas como irreversíveis entretanto as alterações observadas sugerem que a concentração da mistura de metais e partículas metálicas no MPASe não induz esse tipo de lesões após 96h de exposição porém, se o ambiente permanecer contaminado com concentrações iguais ou acima de 0,1 g L⁻¹, os danos podem avançar e se tornarem mais graves como grandes extensões de necrose e fibrose, levando a um sério

comprometimento das funções branquiais desses animais. As alterações observadas após exposição a 1 g L^{-1} MPASe, durante 96h, como o aumento da espessura do epitélio do filamento (hiperplasia) com conseqüente redução da altura da lamela e a redução da distância interlamelar, também é relatada nos estudos de De Angelis e colaboradores (2022) que mostram patologias similares em tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Este estudo correlaciona as patologias ao aumento do esforço ventilatório e comprometimento da capacidade da espécie em enfrentar condições hipóxicas no ambiente aquático. Além disso, a absorção de metais resultou em alterações hematológicas em *O. niloticus* reduzindo a capacidade de transporte de O_2 pelo sangue (Soares et al., 2022), o que sugere a ocorrência da transferência de metais das brânquias para o sangue.

O fígado dos peixes são órgãos diretamente ligados ao processo de desintoxicação e excreção de toxinas no metabolismo, por isso, as alterações podem interferir diretamente nos hepatócitos. Níveis de metais têm sido associados a casos de alterações no fígado, incluindo hipertrofia de hepatócitos e alterações estruturais – como ocorreu no presente estudo - e casos de degeneração nuclear e necrose dos hepatócitos (Odongo et al., 2019).

Nos rins, apesar dos registros de hipertrofia celular e nuclear, a ausência de lesões reversíveis moderadas e irversíveis, sugere que os rins dos peixes não foram morfológicamente muito impactados com os metais encontrados no MPASe e bioconcentrado no órgão. As anormalidades encontradas podem estar associadas a ativação do sistema antioxidante dessas células, uma vez que os rins são os órgãos responsáveis pela osmorregulação, excreção e homeostase do organismo dos animais (Alesci et al., 2022).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As emissões de MPASe pela indústria siderúrgica podem resultar em contaminação cruzada ar-água, em consequência da deposição de contaminantes metálicos nos ecossistemas aquáticos. Entretanto, esta fonte de contaminação não é considerada na maioria dos protocolos de monitoramento ambiental resultando numa contaminação contínua dos animais os quais muitas vezes são utilizados para consumo humano.

A contaminação da água com diferentes concentrações de MPASe, embora não cause mortalidade em *C. parallelus*, causa bioconcentração de metais nos órgãos dessa espécie e, os biomarcadores bioquímicos e morfológicos analisados em brânquias, hepatopâncreas, rins e músculos mostraram que a bioconcentração de elementos metálicos presentes no MPASe altera o equilíbrio redox e gera alterações no sistema antioxidante e histopatológicas em brânquias, hepatopâncreas e rins, principalmente após exposição a 0,1 e 1 g L⁻¹ de MPASe.

Além disso, a bioconcentração de metais nos músculos, parte nobre do peixe, pode causar contaminação em humanos, uma vez que essa espécie é muito apreciada como fonte de proteínas.

Em conclusão, a contaminação aquática pelo MPASe emitido por indústrias siderúrgicas, embora não cause letalidade de peixes, as alterações observadas ressaltam a necessidade da criação de normativas para controle da emissão destes materiais no ambiente natural, a fim de garantir qualidade de vida para os animais e a população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiona, O. O., Anifowose, A. J., Awojide, S. E., Adebisi, O. C., Adesina, B. T., Ipinmoroti, M. O., 2019. Histopathological biomarking changes in the internal organs of Tilápia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to heavy metals contamination from Dandaru Pond, Ibadan, Nigeria. Journal of Taibah University for Science, v. 13, p. 903–911. DOI: <https://doi.org/10.1080/16583655.2019.1658400>

Abreu, L. D, Costa, J. G., Abreu, G. C., Morimoto, T., 2017. Characterization of Dustfall in the neighbourhoods of Ilha do Boi, Vila Velha, and Cidade continental which are part of the Greater Vitoria area – Brazil. A&WMA's 110th Annual conference & exhibition, Pittsburgh, Pennsylvania, Jun 5 - 8, extended Abstract #: 33468.

Adorno, H. A., Souza, I. C., Monferrán, M. V., Wunderlin, D. A., Fernandes, M. N., Monteiro, D. A., 2023. A multi-biomarker approach to assess the sublethal effects of settleable atmospheric particulate matter from an industrial area on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science of the Total Environment, v. 856, p. 159168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>

Ajala, O. A., Oke, M. R., Ajibade, T. F., Ajibade, F. O., Adelodun, B., Ighalo, J. O., Ajala, M. O., Kumar, P., Demissie, H., Ugya, A.Y., Sulaymon, I. D., 2022. Concentrations, bioaccumulation, and health risk assessments of heavy metals in fishes from Nigeria's freshwater: a general overview. Environmental Science and Pollution Research, v. 29, p.82660-82680. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23390-1>

Alesci, A., Cícero, N., Fumia, A., Petrarca, C., Mangifesta, R., Nava, V., Cascio, P. L., Gangemi, S., Gioacchino, M. D., Lauriano, E. R., 2022. Histological and chemical analysis of heavy metals in kidney and gills of *Boops boops*: Melanomacrophages centers and rodlet cells as environmental biomarkers. Toxics, v. 10 (5), p. 218. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics10050218>

ANVISA, 2013. Resolução RDC N°42 Dispõe sobre regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: Ministério da Saúde (saude.gov.br)

Arrivabene, H. P., Souza, I. C., Có, W. L. O., Conti, M. M., Wunderlin, D. A., Milanez, C. R. D., 2015. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in

Brazil. *Chemosphere*, v. 127, p. 27-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.011>

Associação brasileira de normas técnicas – ABNT. 2016. NBR 15088: Análises ecotoxicológicas: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Rio de Janeiro. Acess: <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/23585/nbr15088-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-aguda-metodo-de-ensaio-com-peixes-cyprinidae>

Atli, G., Alptekin, O., Tukel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology and Pharmacology*, v. 143, p. 218-224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.003>

Ballesteros, M. L., Rivetti, N. G., Morillo, D. O., Bertrand, L., Amé, M. V., Bistoni, M. A., 2017. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Science of the Total Environment*, v. 595, p. 711-722. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.203>

Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J., 2010. Oxidative stress: Concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 629-643. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., Guilhermino, L., 2018. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative, damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology*, p. 49-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.008>

Barreiros, A. L., David, J. M., David, J. P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p.113-123. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, v. 22 (1), p. 25-34. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

Beutler, E, 1982. Catalase. In: Beutler, E (ed), Red cell metabolism, A manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York, p. 105 - 106.

Birungi, Z., Masola, B., Zaranyika, A., Naigaga, I., Marshall, B., 2007. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C, v. 32, p. 1350-1358. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pce.2007.07.034>

Borges, J. C. S., Pressinotti, L. N., Gomes, V., da Silva, J. R. M. C., 2010. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, Poey 1860). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 386 (1-2), p. 39-44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.02.013>

Borges, A. C. P., Piassão, J. F. G., Albani, S. M., Albertoni, E. F., Martins, M. C., Cansian, R. L., Valduga, A. T., Hepp, L. U., Mielniczki-Pereira, A. A., 2021. Multiple metals and agricultural use affect oxidative stress biomarkers in freshwater *Aegla crabs*. Brazilian Journal of Biology, v. 82, p. 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.230147>

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Carmo, T. L. L., Azevedo, V. C., Siqueira, P. R., Galvão, T. D., Santos, F. A., Martinez, C. B. dos R., Appoli, C. R., Fernandes, M. N., 2018. Reactive oxygen species and other biochemical and morphological biomarkers in the gills and kidney of the neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, p. 22963-22976. DOI: 25:22963–22976 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2393-4>

Carvalho, T. L. A. B., Nascimento, A. A., Gomes, I. D., Araújo, F. G., 2022. Histological changes in fish hepatopancreas and kidney as indicators of environmental quality in tropical bays. Environmental Biology of Fishes, v. 105, p. 917-931. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01300-1>.

Castro, J. D. S.; 2021. Efeito das mudanças climáticas sobre a qualidade espermática do peixe amazônico *Colossoma macropomum*. Biblioteca Virtual em Saúde. Cap. III, p. 83-90. ID: vtt-219258

Causey, D. R., Pohl, M. A., Stead, D. A., Martin, S. A. A., Secombes, C. J., Macqueen, D. J., 2018. High-throughput proteomic profiling of the fish liver following bacterial infection. *BMC Genomics*, v. 19, p. 719. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5092-0>

Cerqueira, C. C. C., Fernandes, M. N.; 2002. Recuperação do tecido branquial após exposição ao cobre e respostas a parâmetros sanguíneos em peixes tropicais *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 52 (2), p. 83–91. DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2164>

Cerqueira, V. R.; 2005. Cultivo do robalo-peva, *Centropomus parallelus*. In: Baldisserotto, B. e Gomes, L.C. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Ed. UFSM. p. 403-431.

Chakraborty, S. B., 2021. Non-Essential heavy metals as endocrine disruptors: Evaluating impact on reproduction in teleosts. *Proceedings of the Zoological Society*, v. 74, p. 417–431. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12595-021-00399-x>

Chen, Y. G., Huang, J. H., Luo, R., Ge, H. Z., Wołowicz, A., Wawrzekiewicz, M., Gładysz-Płaska, A., Li, B., Yu, Q. X., Kołodyńska, D., Lv, G.Y., 2021. Impacts of heavy metals and medicinal crops on ecological systems, environmental pollution, cultivation, and production processes in China. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 219, p. 112336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112336>

Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F., 2003. Chapter 18 Fish as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, v. 6, p. 639-676. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80148-0](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80148-0)

Conselho nacional do meio ambiente – CONAMA. Resolução nº 491 de November 19, 2018. Access: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/51058895/do1-2018-11-21-resolucao-n-491-de-19-de-novembro-de-2018-51058603

Costa, J. G., Coronel, J. O., Queiroz, R. S., Morimoto, T., Albuquerque, A. S., Macedo, W. A. A., Ardisson, J. D., Fernandezouton, L. E., 2019. Study of atmospheric particulate

matter by ^{57}Fe Mössbauer and Chemical Mass Balance Measurements. A&WMA's 112th Annual Conference & Exhibition, Québec City, Québec, June 25-28, Paper # 601022.

De Angelis, C. F., Soares, M. P., Cardoso, I. L., Filogonio, R., Taylor, E.W., McKenzie, D. J., Souza, I. C., Wunderlin, D. A., Monferrán, M. V., Fernandes, M. N., Leite, C. A. C., 2022. Settleable atmospheric particulate matter affects cardiorespiratory responses to hypoxia in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 257, p. 109353. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109353>

De Lima, W. F.; Gutjahr, A. L. N.; Braga, C. E. S., 2022. Bioaccumulation and translocation potential of *Montrichardia linera* (Arruda) Schott (Araceae) in lead contaminated water. *Revista Diálogos & Ciência*, v. 2 (1). DOI: <https://doi.org/10.7447/1678-0493.2022v2n1p48-59>

Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L. Tablada, M.; Robledo, C. W., 2012. InfoStat Group, Faculdade de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Access: <http://www.infostat.com.ar>

El-Naggar, A. M., Mahamoud, S. A., Tayel, S. I., 2009. Bioaccumulation of some heavy metals and histopathological alterations in liver of *Oreochromis niloticus* in relation to water quality at different localities along the river Nile, Egypt. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, v. 1 (2), p. 105-114.

Fatima, M., Usmani, N., Fidaus, F., Zafeer, M. F., Ahmad, S., Akhtar, K., Husain, S. M. D., Ahmad, M. H., Anis, E., Hossain. M. M., 2015. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 176-177, p. 17-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.07.004>

Fernandes, M. N., Sakuragui, M. M., Paulino, M. G., Henrique, H. S., Benze, T. P., 2012. Aquatic Ecosystem Monitoring: The use of fish as biological model. Em: Odila Rigolin de Sá (Org.) *Bacia Hidrográfica: Estudos do Rio Grande no Sudoeste de Minas Gerais-Brasil*, p.63-80.

Ferreira, S. C. D. R., 2020. Efeitos histopatológicos em fígado de pregado (*Scophthalmus maximus*) exposto cronicamente a concentrações ambientalmente realísticas de metais pesados (Doctoral dissertation). Repositório institucional da universidade Fernando Pessoa. URI: <http://hdl.handle.net/10284/9327>

Fontenele, A. P. G., Pedrotti, J. J., Fornaro, A., 2009. Evaluation of trace metals and major ions concentrations in rainwater in downtown São Paulo city. *Química Nova*, v. 32, p. 839-844. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400003>

Fortes, W. M. P. A., 2021. Bioacumulação de metais presentes no material particulado atmosférico sedimentável em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Repositório institucional UFSCar. URI: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/14899>

Gabriel, F. A., Hauser-Davis, R. A., Soares, L., Mazzuco, A. C. A., Rocha, R. C. C., Pierre, T. D. S., Saggiaro E., Correia, F. V., Ferreira, T. O., Bernandino, A. F., 2020. Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *Environmental Science* (8). DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.10266>

Galvão, E. S., Santos, J. M., Goulart, E. V., Reis Jr, N. C., 2023. Health risk assessment of inorganic and organic constituents of the coarse and fine PM in an industrialized region of Brazil. *Science of the Total Environment*. v. 865, p. 161042. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161042>

Galvão, E. S., Santos, J. M., Lima, A. T., Reis Jr, N. C., Stuetz, R. M., Orlando, M. T. D. A., 2018. Resonant synchrotron X-ray diffraction determines markers for iron-rich atmospheric particulate matter in urban region. *Chemosphere*, v. 212, p. 418-428. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.111>

Garai, P., Banerjee, P., Mondal, P., Saha, N. C., 2021. Effect of heavy metals on fishes: Toxicity and bioaccumulation. *Journal of Clinical Toxicology*, v. 11, S18:001.

Garnero, P. L., Bistoni, M. D. L. A., Monferran, M. V., 2020. Trace element concentrations in six fish species from freshwater lentic environments and evaluation of possible health risks according to international standards of consumption. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27 (22), p. 27598-27608. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08756-7>

Griboff, J., Wunderlin, D. A., Monferran, M. V., 2017. Metals, As and Se determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in edible fish collected from

three eutrophic reservoirs. Their consumption represents a risk for human health?. *Microchemical Journal*, v. 130, p. 136-144. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.013>

Griboff, J., Horacek, M., Wunderlin, D. A., Monferran, M. V., 2018. Bioaccumulation and trophic transfer of metals, As and Se through a freshwater food web affected by anthropic pollution in Córdoba, Argentina. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 148, p. 275-284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.028>

Grotto, H. Z. W., 2008. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 30 (5), p. 390-397. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842008000500012>

Gutiérrez-Martínez, P. B., Torres-Morán, M. I., Romero-Puertas, M. C., Casas-Solís, J., Zarazúa-Villaseñor, P., Sandoval-Pinto, E., Ramírez-Hernández, B. C., 2020. Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress. *Biotecnia*, v. 22 (2), p. 110-118. DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1252>

Hua Li, Z., Li, P., Wu, Y., 2021. Regulation of glutathione antioxidant defense system of grass carp *Ctenopharyngodon Idella* under the combined stress of mercury and temperature. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28., p. 1689-1696. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-10587-5>

Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA), 2021. Governo do Estado do Espírito Santo. Access in: <https://iema.es.gov.br/>

Jain, R., Singh, S. P., Singh, A., Singh, S., Tripathi, P., Chandra, A., Solomon, S., 2016. Study on physio-biochemical attributes and metallothionein gene expression affected by chromium (VI) in sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*). *Journal of Environmental Biology*, v. 37 (3), p. 375.

Javed, M., Ahmad, I., Usmani, N., Ahmad, M., 2016. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. *Chemosphere*, v. 151, p. 210-219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.080>

Jesus, W. B., Soares, S. H., Pinheiro-Sousa, D. B., Andrade, T. S. O. M., Oliveira, S. R. S., Santos, F. S., Santos, D. M. S., Carvalho-Neta, R. N. F., 2020. Enzymatic and histological biomarkers in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) gills indicative of environmental impacts in a port region of northeastern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, p. 1413-1423. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11666>

Jiang, Y., Wang, L., Qu, Z., Wang, C., Yang, Z., 2017. Effects on heavy metal accumulation on freshwater fishes: species, tissues, and sizes. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 9379-9386. DOI: [10.1007/s11356-017-8606-4](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8606-4)

Jiao, Q., Han, Q., Xu, Y., Jiang, H., Xing, H., Teng, X., 2019. Impaired immune function and structural integrity in the gills of common carp (*Cyprinus carpio* L.) caused by chlorpyrifos exposure: Through oxidative stress and apoptosis. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 86, p. 239-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.060>

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, v. 78, p. 846-852. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.044>

Jiang, Z.Y., Woollard, A.C. and Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26 (10), p. 853-856. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02536169>

Keen, J. H.; Jakoby, W. H., 1976. Mechanism for several activities of glutathione Stransferases. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 251, p. 6183-6188.

Kellner, R., Otto, M., Widmer, H. M., Mermet, J., 1998. *Analytical Chemistry*. Ed. Wiley VCH.

Lakra, K. C., La, B., Banerjee, T. K., 2019. Coal mine effluent-led bioaccumulation of heavy metals and histopathological changes in some tissues of the catfish *Clarias batrachus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 191, p. 136. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7229-2>

- Lambert, A. J., Brand, M. D., 2009. Mitochondrial DNA - Methods and protocols - Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods in Molecular Biology*, v. 554, p. 165-181. DOI: 10.1007/978-1-59745-521-3_11
- Lesser, M. P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, v. 68, p. 253–278. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001
- Long, S., Dong, X., Liu, H., Yan, X., Tan, B., Zhang, S., Chi, S., Yang, Q., Liu, H., Yang, Y., Zhang, H., 2022. Effect of dietary oxidized fish oil on liver function in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus fuscoguttatus*). *Aquaculture Reports*, v. 22, p. 101000. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.101000>
- Rainbow, P. S., Luoma, S. N., 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates – modelling zinc in crustaceans. *Aquatic Toxicology*, v. 105, p. 455-465. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.001>
- Malham, S. K., Rajko-Nenow, P., Howlett, E., Tuson, K. E., Perkins, T. L., Pallett, D. W., Wang, H., Jago, C. F., Jones, D. L., McDonald, J. E., 2014. The interaction of human microbial pathogens, particulate material and nutrients in estuarine environment and their impacts on recreational and shellfish waters. *Environment Science: Processes & Impacts*, v. 16, p. 2145-2155. DOI: 10.1039/C4EM00031E
- Malik, N., Biswas, A. K., Qureshi, T. A., Borana, K., Virha, R., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 160 (267), p. 267-276. DOI 10.1007/s10661-008-0693-8
- Matos, A. R. D., 2021. Estudo de avaliação de risco e biomonitoramento na bacia do rio Doce após o rompimento da barragem do fundão. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade. URI: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2919>
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 244 (22), p. 6049-6055. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Menegat, M. N., Loureiro, R. C., Dal Magro, J., Restello, R. M., Hepp, L. U., 2020. Biodisponibilidade de metais em riachos e a acumulação por insetos aquáticos. *Revista*

Perspectiva, v. 44 (165), p. 21-33.

DOI: <https://doi.org/10.31512/persp.v.44.n.165.2020.71.p.21-33>

Mohanty, A., Samanta, L., 2016. Multivariate analysis of potential biomarkers of oxidative stress in *Notopterus notopterus* tissues from Mahanadi River as a function of concentration of heavy metals. *Chemosphere*, v. 155, p. 28-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.035>

Molisani, M. M., Esteves, F. D. A., Lacerda, L. D. D., Rezende, C. E. D., 2013. Emissões naturais e antrópicas de nitrogênio, fósforo e metais para a bacia do Rio Macaé (Macaé, RJ, Brasil) sob influência das atividades de exploração de petróleo e gás na Bacia de Campos. *Química Nova*, v. 36, p. 27-66. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000100006>

Monferran, M. V., Garnero, P. L., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A., 2016. Potencial human health risks from metals and As via *Odontesthes bonariensis* consumption and ecological risk assessments in a eutrophic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 129, p. 302-310. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.030>

Morais, T. D. C., Dias, D. C. F. D. S., Pinheiro, D. T., Gama, G. F. V., Silva, L. J. D., 2021. Physiological quality and antioxidant enzymatic action in sunflower seeds exposed to deterioration. *Revista Caatinga*, v. 34, p. 570-579. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252021v34n308rc>

Morozeck, M., Souza, I. C., Fernandes, M. N., Soares, D. C. F., 2021. Airborne particulate matter in an iron mining city: Characterization, cell uptake and cytotoxicity effects of nanoparticles from PM_{2.5}, PM₁₀ and PM₂₀ on human lung cells. *Environmental Advances*, v. 6, p. 100125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100125>

Moschem, C. D., Gonçalves, J. P. R., 2020. Impacto Toxicológico de Metais Pesados: Uma Análise de Efeitos Bioquímicos e Celulares: Impact of heavy metals: An analysis of biochemical and cellular effects. *Health and Biosciences*, v. 1 (2), p. 88-100. URI: <https://periodicos.ufes.br/healthandbiosciences>

Naigaga, H., Muller, W. J., Ojok, L., Mbabazi, D., Magezi, G., Muhumuza, E., 2011. Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria Wetlands, Uganda. *Physics and Chemistry of Earth, Parts A/B/C*, v. 36, p. 918-928. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pce.2011.07.066>

Organisation for economic co-operation and development (OECD). OECD Guideline for testing of chemicals. 2019. Test Guidelines no. 203: Fish, acute toxicity testing test

Odongo, K. O., Otieno, S. A., Sharma, R. R., 2019. Effects of selected heavy metals on morphology of *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus* along Ruiru River, Kenya. Bonoewo Wetlands, v. 9 (2), p. 91-107. DOI: 10.13057/bonorowo/w090204

Paschoalini, A. L., Bazzoli, N., 2021. Heavy metals affecting neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. Aquatic Toxicology, v. 237, p. 105906. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105906>

Paulino, M. G., Souza, N. E. S., Fernandes, M. N., 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 80, p. 6-13. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.02.001.

Piassão, J., Gasparin, B., Martins, M., Decian, V., Cansian, R., Restello, R., Mielniczki-pereira, A. A., 2019. Analysis of metals bioaccumulation and oxidative stress biomarkers in crustaceans of *Aegla genus* (Crustacea, Anomura). Perspectiva, v. 43 (161), p.111-122.

Reboa, A., Mandich, A., Cutroneo, L., Carbone, C., Malatesta, A., Capello, M., 2019. Baseline evaluation of metal contamination in teleost fishes of the Gulf of Tigullio (north-western Italy): Histopathology and chemical analysis. Marine Pollution Bulletin, v. 141, p. 16 - 23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.024>

Rehman, A. U., Nazir, S., Irshad, R., Tahir, K., Rehman, K. U., Islam, R. U., Wahab, Z., 2021. Toxicity of heavy metals in plants and animals and their uptake by magnetic iron oxide nanoparticles. Journal of Molecular Liquids, v. 321, p. 114455. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114455>

Reznick, A. Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In methods in enzymology, v. 233 (38), p. 357-363. Academic press. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)

Ruas, C. B. G., Carvalho, C. S., Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., Fernandes, M. N., 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of three cichlid species from a polluted river. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 71, p. 86–93 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.08.018>

Santos, I. G. S., Lira, A. S., Montes, C. S., Frédou, F. L., Rocha, R. M., 2021. Histopathological biomarkers as indicators of the environmental quality of two estuaries in Northeastern Brazil. *Research square*, v. 1, p. 1-31. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1081992/v1>

Santos, J. M., Reis, N. C., Galvão, E. S., Silveira, A., Goulart, E. V., Lima, A. T., 2017. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24 (27), p. 22026-22039. DOI: [10.1007/s11356-017-9677-y](https://doi.org/10.1007/s11356-017-9677-y)

Santos, V. B., 2007. Morphologic aspects of fish lateral muscles. *Instituto de Pesca*, v. 33 (1), p. 127-135.

Schvezov, N., Wilson, R. W., Urbina, M. A., 2022. Oxidative damages and antioxidant defences after feeding a single meal in rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology*, v. 192, p. 459-471. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00360-022-01435-8>

Shahjahan, M., Talisma, K., Rahman, M. S., Emran, M. A., Alam, S. I., Faggio C., 2022. Effects of heavy metals on fish physiology – A review. *Chemosphere*, v. 300, p. 134519. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134519>

Silva, C. A., Mafra Jr, L. L., Rossi, G. R., Trindade, E. S., Matias, W. G., 2022. A simple method to evaluate the toxic effects of *Prorocentrum lima* extracts to fish (sea bass) kidney cells. *Toxicology In Vitro*, v. 85, p. 105476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105476>

Soares, M. P., De Angelis, C. F., Cardoso, I. L., McKenzie, D. J., Souza, I. C., Wunderlin, D. A., Monferrán, M. V., Fernandes, M. N., Leite, C. A. C., 2022. Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 257, p.109330. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330>

Souza, I. C., Duarte, I. D., Pimentel, N. Q., Rocha, L. D., Morozesk, M., Bonomo, M. M., Azevedo, V. C., Pereira, C. D., Monferrán, M. V., Milanez, C. R., Matsumoto, S. T., 2013. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical

estuaries. *Environmental Pollution*, v. 180, p. 136-144. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.017>

Souza, I. C., Morozesk, M., Bonomo, M. M., Azevedo, V. C., Sakuragui, M. M., Elliott, M., Matsumoto, S. T., Wunderlin, D. A., Baroni, M. V., Monferrán, M. V., Fernandes, M. N., 2018 a. Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 161, p. 260-269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.068>

Souza, I. C., Arrivabene, H. P., Craig, C. A., Midwood, A. J., Thornton, B., Matsumoto, S. T., Elliott, M., Wunderlin, D. A., Monferrán, M.V., Fernandes, M. N., 2018 b. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. *Science of the Total Environment*, v. 640, p. 501-511. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.302>

Souza, I. C., Mendes, V. A., Duarte, I. D., Rocha, L. D., Azevedo, V. C., Matsumoto, S. T., Elliott, M., Wunderlin, D. A., Monferrán, M. V., Fernandes, M. N., 2019. Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. *Science of the Total Environment*, v. 658, p. 798-808. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.142>

Souza, I. C., Morozesk, M., Mansano, A. S., Mendes, V. A., Azevedo, V. C., Matsumoto, S. T., Elliott, M., Monferrán, M. V., Wunderlin, D. A., Fernandes, M. N., 2021 a. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, v. 753, p.141976. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141976>

Souza, I. C., Morozesk, M., Azevedo, V. C., Mendes, V. A., Duarte, I. D., Rocha, L. D., Matsumoto, S. T., Elliott, M., Baroni, M. V., Wunderlin, D. A., Monferrán, M. V., 2021 b. Trophic transfer of emerging metallic contaminants in a neotropical mangrove ecosystem food web. *Journal of Hazardous Materials*, v. 408, p. 124424. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124424>

Souza, I. C., Arrivabene, H. P., Azevedo, V. C., Duarte, I. D., Rocha, L. D., Matsumoto, S. T., Franco, A., Elliott, M., Wunderlin, D. A., Monferrán, M. V., Fernandes, M. N., 2021 c. Different trophodynamics between two proximate estuaries with differing degrees

of pollution. *Science of the Total Environment*, v. 770, p. 144651. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144651>

Souza, I. C., Morozesk, M., Siqueira, P., Zini, E., Galter, I. N., De Moraes, D. A., Matsumoto, S. T., Wunderlin, D. A., Elliot, M., Fernandes, M. N., 2022. Metallic nanoparticle contamination from environmental atmospheric particulate matter in the last slab of the trophic chain: Nanocrystallography, subcellular localization and toxicity effects. *Science of the Total Environment*, v. 814, 152685. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152685>

Stark, A. A. P., Bonfada, C.O., Zani, G. S., de Paula, L. S., Teles, M. A., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., França, R. T., 2022. Metais pesados e sua relação com o estresse oxidativo em répteis. *Research Society and Development*, v. 11 (3), p. 1-12. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26571>

Steinhagen, D., Helmus, T., Maurer, S., Michael, R. D., Leibold, W., Scharsack, J. P., Skouras, A., Schuberth, H., 2004. Effect of hexavalent carcinogenic chromium on carp *Cyprinus carpio* immune cells. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 65, p. 155 – 161. DOI: [10.3354/dao062155](https://doi.org/10.3354/dao062155)

Tavares, M. S., Sausen, D., Schorr, M. R. W., Marques, A. C. R., 2020. Estresse por ferro nas plantas: uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Development*, v. 6 (5), p. 28825-28835. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-361>

Tsai, H., Wu, P., Huang, J., Chen, S., 2021. Environmental pollution and chronic kidney disease. *International Journal of Medical Sciences*, v. 18 (5), p. 1121-1129. DOI: [10.7150/ijms.51594](https://doi.org/10.7150/ijms.51594)

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, v. 44 (1), p. 69-84. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

Vinodhini, R., Narayanan, M., 2009. Heavy metal induced histopathological alterations in selected organs of the *Cyprinus carpio* L. (Common carp). *International journal environmental research*, v. 3 (1), p. 95-100. ISSN: 1735-6865

Vicente, N. M. D. F.; Sperber, C. F.; Carneiro, M. A., 2021. Dia do Rio Doce: Um olhar científico sobre o maior desastre socioambiental do Brasil, p. 78-91, Ed. UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Voigt, C. L., Silva, C. P. D., Campos, S. X. D., 2016. Avaliação da bioacumulação de metais em *Cyprinus carpio* pela interação com sedimento e água de reservatório. Química Nova, v. 39, p.180-188. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160014>

Xu, Y., Liu, G., Xu, Y., Zhao, T., Zheng, H., Tan, X., 2022. Physiological and transcriptomic analyses reveal the toxicological mechanism and risk assessment of environmentally-relevant waterborne tetracycline exposure on the gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science of the Total Environment, v. 806, p. 151290. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151290>

Waheed, S., Kamal, A., Malik, R. N., 2014. Human health risk from organ-specific accumulation of toxic metals and response of antioxidants in edible fish species from Chenab River, Pakistan. Environmental Science and Pollution Research, v. 21, p. 4409-4417. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2385-3>

Witkowska, D., Stowik, J., Chilicka, K., 2021. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites. Molecules, v. 26 (19), p. 6060. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26196060>

White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. Analytical Biochemistry, v. 318 (2), p. 175-180. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00143-X)

Wood, C. M., 2011. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In fish physiology, v. 31, p. 1-51. Academic Press. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31001-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31001-1)

Yadav, S. K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. South African Journal of Botany, v. 76 (2), p. 167-179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>