

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

LUANA BESERRA DE CARVALHO

**VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS, IMUNOLÓGICAS E REGULAÇÃO IÔNICA EM  
TILÁPIA-DO-NILO, *OREOCHROMIS NILOTICUS* COLETADAS EM LAGOAS DA  
GRANDE VITÓRIA -ESPÍRITO SANTO- EM ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE  
ATIVIDADES METALÚRGICAS**

SÃO CARLOS – SP

2024

LUANA BESERRA DE CARVALHO

**VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS, IMUNOLÓGICAS E REGULAÇÃO IÔNICA EM  
TILÁPIA-DO-NILO, *OREOCHROMIS NILOTICUS* COLETADAS EM LAGOAS DA  
GRANDE VITÓRIA - ESPÍRITO SANTO - EM ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE  
ATIVIDADES METALÚRGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Dra. Marisa Narciso Fernandes

Coorientadora: Dra. Iara da Costa Souza

SÃO CARLOS – SP

2024

Beserra de Carvalho, Luana

Variáveis hematológicas, imunológicas e regulação iônica em tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* coletadas em lagoas da Grande Vitória -Espírito Santo, em áreas de influência de atividades metalúrgicas / Luana Beserra de Carvalho -- 2024.

123p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Marisa Narciso Fernandes

Banca Examinadora: Marisa Narciso Fernandes, Juliana Delatim Simonato Rocha, Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais

Bibliografia

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Hematologia. 3. Osmorregulação. I. Beserra de Carvalho, Luana. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins -CRB/8 7180



# 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 Luana Beserra de Carvalho, realizada em 26/07/2024.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha (UEL)

Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais (UFG)

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

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por todo o amor e suporte que me deram.  
À minha noiva, Gabriella, por ser meu alicerce em todos os momentos.  
Aos meus familiares, pelo apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Sinto que escrevendo não consigo transmitir quão grata sou por cada um que passou pela minha trajetória. Entretanto, apesar de achar difícil colocar em palavras, gostaria de ressaltar alguns agradecimentos aqui.

Agradeço, primeiramente, a pessoa que esteve ao meu lado em todos os momentos, minha noiva Gabriella. Só ela sabe quanto essa trajetória foi difícil e o quanto me fortaleceu. Obrigada por estar comigo nos momentos de felicidade e nos momentos de tristeza e insegurança. Você me apoiou em cada novo desafio que se erguia na minha frente e nunca me esquecerei disso. Afinal, quando olho para trás, eu te vejo ao meu lado em cada detalhezinho. Muito obrigado por ser essa parceira incrível. Te amo demais (OMAETUE).

Agradeço a minha mãe, Silvonete, por se fazer tão presente mesmo de longe e por deixar seu “bebê grande” voar, mesmo que no fundo quisesse me manter debaixo dos seus braços. Sou muito grata por tudo que me ensinou, por se preocupar comigo e cuidar de mim, me ajudando com a psicóloga. Foi muito importante para minha trajetória me expor a situações que desafiariam o meu intelecto, mas mais que isso, a minha saúde mental. Apesar das batalhas que tive que enfrentar nessa caminhada, eu consegui me manter de pé. Graças a tudo o que você me ensinou. Então muito obrigada por ser essa mulher incrível e extremamente forte, apesar de miudinha. Eu te amo demais.

Agradeço ao meu pai, Sérgio (meu carequinha), que apesar de ser mais fechado eu sinto seu amor pelos abraços e pelos gestos. Muito obrigado por todo o suporte que me deu, eu não poderia estar aqui sem a sua ajuda. Muito obrigada pelas trocas que tivemos desde pequena até hoje, pelas brincadeiras de lutinha, pelos jogos de estratégia e pelo exemplo de organização. Obrigado por acreditar em mim mesmo sem dizer isso, porque eu sinto. Afinal você era meu confidente. Quero que saiba que estou aqui para tudo e que vou ser para sempre tua “fia”. Te amo demais.

Tenho muito orgulho de ser filha de vocês dois.

Agradeço a minha irmã por todas as vezes que ela veio me visitar e reacendeu uma chama aqui dentro de mim. Eu tenho muito orgulho de você, viu. Nunca deixe ninguém apagar essa luz, que cada dia está mais aparente em você. Te amo muito.

Agradeço aos meus sogros, Marlene e Roberto, por todo o cuidado que sempre tiveram comigo, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos, quando eu nem sabia que eram sonhos. Obrigado pelos passes nos momentos de turbulência, por todas as risadas e ótimas histórias. Obrigado por todo o suporte que nos dão mesmo estando longe. Vocês são incríveis e agradeço à Deus por ter colocado vocês na minha vida. Amo vocês e a Gikinha também.

Agradeço aos meus tios e tias (tia Coroa, tio Valmir, tia Ney, tia Fernanda, tio Márcio, tia Nenê, tio Marcos, tia Tata e tio Tato) por toda a força que me deram quando me mudei para São Carlos. Aqui em casa tem um pedacinho de vocês por todo o canto. Sou muito grata a todos por emanarem tanta energia boa para que eu consiga seguir com a minha trajetória.

Agradeço à minha psicóloga Lúcia que ajudou muito no meu processo de amadurecimento e autoconhecimento. Você me ajudou a enxergar a minha própria força e a lidar melhor com as situações difíceis. Pode ter certeza, que a Luana que eu sou hoje tem muita influência sua e que a Luana que começou a passar contigo, lá em Agosto de 2022, agradece demais.

Agradeço à Mari Morozesk pelos vários aprendizados e pela paciência em me explicar como fazer as coisas da melhor forma. Além claro, de agradecer a paciência de me explicar conceitos básicos que me ajudaram a entrar no mestrado. Nunca vou me esquecer do apoio que me deu para eu passar na prova. Muito obrigado.

Agradeço à Michelly por me ensinar tudo o que eu precisava para conseguir efetuar a coleta de sangue, as análises com êxito e a interpretação dos resultados. Agradeço também por ter me apoiado em ser a primeira autora do artigo. Significou muito para mim.

Agradeço à Anieli que me auxiliou na escrita do artigo quando ele ainda era só o “esqueleto”. Obrigado por ter me auxiliado, me tirado dúvidas e me orientado em diversos momentos. Sou muito grata.

Só para não perder o costume. Anieli e Michelly eu vou dar um “uap” em vocês!

Agradeço à professora Helen por ter me ensinado e me acompanhado na bioquímica. Ah, e obrigado pelos vários podcasts de terror, que deixaram vários momentos mais leves, apesar disso parecer meio controverso.

Agradeço à professora Diana por diversos momentos disponibilizar do seu tempo para me tirar várias dúvidas, por me dar alguns conselhos e por não me processar por ter dado um susto nela sem querer.

Agradeço ao Gustavo por me ensinar a manusear grande parte dos equipamentos do laboratório.

Agradeço à Lara por ter me dado a oportunidade de atuar como TT-III, isso me deu uma boa base sobre as técnicas e procedimentos dentro de um laboratório. Agradeço também, pela reta final, que me ajudou com as análises multivariadas e com a prorrogação do Mestrado. Não posso esquecer de agradecer o sorvete da Borelli.

Agradeço, em especial, à Hevelyn, ao Diego e ao Sr. Luizinho pelo apoio que me deram na coleta, tanto profissional quanto pessoal. Eu nunca vou esquecer do apoio e do cuidado que tiveram comigo. Muito obrigado de coração.

Agradeço à Maira, minha parceira de trajetória e de projeto. Exploramos o mundo a fora juntas. Brincadeira, foi só um país, mas isso já é legal demais. Obrigado pelos momentos que tivemos e pelas diversas discussões. “E ai qualé?”

Agradeço a Carolzinha, a Mari e ao Will pelos momentos que compartilhamos tanto no laboratório, quanto no Congresso, foi incrível demais. Muito obrigado pelas lembranças que construímos. “Voltamos já com TOXI-LATIN”

Gostaria de agradecer ao Marco, ao Fabrício e à Rafaela, pelas trocas que tivemos, apesar de pouco tempo, foram muito legais e me agregaram bastante.

Gostaria de agradecer a minha Orientadora, Marisa. Ela pegou na minha mão quando nem eu mais acreditava no meu potencial. Muito obrigada por acreditar em mim. Sou muito grata pelas suas palavras, que em vários momentos me fizeram olhar para mim mesma e me enxergar como pesquisadora. Muito obrigada.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, à Fapesp (Processo 2019/08491-0) pelo suporte financeiro e ao PROAP pelos recursos de auxílio financeiro estudante.

Agradeço ao Prof. Dr Pedro Pierre Mendonça e à Profa. Dra. Silvia T. Matsumoto e o seus alunos pelo apoio logístico nas coletas realizadas nas lagoas.

Agradeço ao Dr. Daniel A. Wunderlin e à Dra. Magdalena V Monferrán – Universidade de Córdoba, Argentina pelas análises químicas.

Muito obrigado a todos.

## EPIGRAFE

*“O que fazemos agora ecoa na eternidade.”*

**Marco Aurélio**

## RESUMO

Os ecossistemas aquáticos, principalmente os localizados próximos a centros urbanos e a atividades metalúrgicas, são receptores de águas residuais e deposição de material particulado provenientes das atividades do seu entorno. O Brasil está entre um dos maiores produtores e exportadores de minério de ferro, tendo destaque o estado do Espírito Santo, onde se localizam dois dos maiores complexos metalúrgicos do país, o Complexo de Tubarão e Ubu. Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o sangue, brânquias e rins de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* coletados em lagoas costeiras influenciadas por atividades metalúrgicas (Maembá e Carapebus) e em um sistema de aquicultura (Alegre) localizado em Alegre, a 140 km de indústrias metalúrgicas, como referência. Água, sedimento e sangue, brânquias e rins de *O. niloticus* coletadas nessas lagoas e em Alegre foram analisados quanto a presença e concentração de metais. Nos peixes, o fator de condição relativo ( $Kn$ ) e multibiomarcadores (hematológicos, imunológico, fisiológico, de genotoxicidade e mutagenicidade) foram analisados no sangue (plasma e eritrócitos) para avaliar a higidez animal, e multibiomarcadores (bioquímicos, fisiológicos e morfológicos) foram analisados nas brânquias e nos rins para avaliar homeostase osmótica e iônica. Os parâmetros físico-químicos da água influenciam o ecossistema desses lagos, a biodisponibilidade de metais e os mecanismos osmorregulatórios. A análise dos componentes principais separou Alegre das demais lagoas que são influenciadas por resíduos de indústrias metalúrgicas. Apesar de alguns metais na água e sedimento de Alegre serem mais altos que nas lagoas, as concentrações de metais no sangue dos peixes de Alegre foram menores comparados com o dos peixes coletados em Maemba e Carapebus enquanto nas brânquias e rins, alguns metais foram mais altos que nas lagoas. Os peixes da lagoa Maemba M1 apresentaram quadro de anemia e menor osmolalidade. Os peixes da lagoa Carapebus apresentaram maior percentual de micronúcleos sugerindo a presença de agentes genotóxicos na água ou sedimento e a maior concentração de íons  $Cl^-$  no plasma, o que pode estar relacionado a um ajuste à água salobra em que vivem. A atividade das enzimas  $Na^+/K^+$ -ATPase,  $H^+$ -ATPase e anidrase carbônica, área fracional dos ionócitos na superfície branquial e área nos túbulos renais variaram nos peixes das lagoas devido as características físico-químicas e concentração de metais distintas das lagoas. Em conclusão, os peixes de Alegre apresentaram as melhores condições de saúde quando comparado aos peixes localizados nas lagoas próximas às atividades metalúrgicas confirmando a hipótese de que os peixes coletados nas lagoas próximas as atividades metalúrgicas têm a higidez mais comprometida devido as influências antrópicas ao seu redor em comparação com os peixes de região com ausência dessas indústrias (Alegre).

**PALAVRAS-CHAVE:** Metais, Hematologia, Sistema imune, Genotoxicidade, Osmorregulação, Ionócitos, Brânquias, Rins, Metalurgia.

## ABSTRACT

Aquatic ecosystems, especially those located close to urban centers and metallurgical activities, are receptors of wastewater and deposition of particulate matter from surrounding activities. Brazil is one of the largest producers and exporters of iron ore, with emphasis on the state of Espírito Santo, where two of the largest metallurgical complexes in the country are located, the Tubarão and Ubu Complex. In this scenario, this study aimed to evaluate the blood, gills and kidneys of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* collected in coastal lagoons influenced by metallurgical activities (Maemba and Carapebus) and in an aquaculture facility (Alegre) located in Alegre, 140 km from metallurgical industries. Water and sediment, and blood, gills and kidneys of *O. niloticus* collected in these lagoons and in Alegre were analyzed for the presence and concentration of metals. In fish, the relative condition factor (Kn) and multibiomarkers (hematological, immunological, physiological, genotoxicity and mutagenicity) were analyzed in the blood (plasma and erythrocytes) to evaluate animal health, and multibiomarkers (biochemical, morphological and physiological) were analyzed in the gills and kidneys to verify the mechanisms of osmotic and ionic regulation. The physical and chemical parameters of the water influence the ecosystem of these lagoons, the bioavailability of metals and the osmoregulation. The analysis of the main components separated Alegre from the other lagoons that are influenced by waste from metallurgical industries. Although some metals in the water and sediment of Alegre were higher than in the lagoons, the concentrations of metals in the blood of fish from Alegre were lower compared to that of fish collected in Maemba and Carapebus, while in the gills and kidneys, some metals were higher. higher than in the lagoons. Fish from the Maemba M1 lagoon showed anemia and lower osmolality. Fish from the Carapebus lagoon had higher percentage of micronuclei suggesting the presence of genotoxic agents in the water or sediment, and had the highest Cl<sup>-</sup> concentration, which may be related to an adjustment to the brackish water in which they live. The activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, H<sup>+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase enzymes, ionocyte fractional area in the gill surface and in renal tubular area varied in the fish of lagoons due to physicochemical characteristics and metal concentration of the lagoons. In conclusion, fish from Alegre have the best health conditions when compared to fish located in lagoons close to metallurgical activities confirming the hypothesis that fish collected in lagoons close to mining and steel activities have a more compromised health due to the human influences around them compared to fish from a region without these industries (Alegre).

**KEYWORDS:** Metals, Hematology, Immune system, Genotoxicity. Osmoregulation. Ionocytes. Gills. Kidneys. Metallurgy.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

---

**Figura 1.** Estado do Espírito Santo, Brasil, indicando os 3 locais de coleta de *Oreochromis niloticus*, Alegre distante das indústrias metalúrgicas e as lagoas Maemba e Carapebus próximas das indústrias. A. Região correspondente ao Complexo de Tubarão (1) e Lagoa de Carapebus (2); B- Ponto de coleta na lagoa de Carapebus (1); C- Região correspondente à indústria metalúrgica (1) e lagoa Maemba (2); D- Ponto de coleta na lagoa da Maemba (pontos 1 e 2)

**Figura 2.** *Oreochromis niloticus*, Tilápia-do-Nilo. (Foto: Museu Nacional)

### CAPÍTULO II

---

Figura 1. Relação entre o comprimento total e a massa corpórea de *O. niloticus* (A) e o fator de condição relativo ( $K_n$ ) em relação ao comprimento total (B) de *O. niloticus* (n=12 cada local) coletados em diferentes lagos: Alegre (A), Carapebus (C), Maemba ponto 1 (M1) e Maemba ponto 2 (M2)

Figura 2. Biomarcadores imunológicos em tilápia-do-nilo, *O. niloticus* (n=12), coletados nas lagoas Alegre (A), Maemba Ponto1 (M1), Maemba Ponto 2 (M2) e Carapebus (C). A: Atividade respiratória leucocitária, B: Concentração sérica de lisozima e C: Proteína plasmática total (TPP). Valores representados por média  $\pm$  SEM (n=12). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Figura 3. Biomarcadores de estresse fisiológico em tilápia-do-nilo, *O. niloticus* (n=12), coletados nas lagoas Alegre (A), Maemba Ponto1 (M1), Maemba Ponto 2 (M2) e Carapebus (C). A: Cortisol, B: Glicose. Valores representados por média  $\pm$  SEM (n=12). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Figura 4. Biplots de PCA representando respostas de biomarcadores sanguíneos de *O. niloticus* (A), biomarcadores sanguíneos e metais em eritrócitos de *O. niloticus* (B) e biomarcadores sanguíneos e metais em plasma de *O. niloticus* (C). Os agrupamentos estão relacionados a diferentes lagoas (Alegre, Maemba ponto 1 e 2 e Carapebus). Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; PPT: proteína plasmática total; CTS: cortisol; SLC: lisozima; G: glicose; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular; HCM: hemoglobina corpuscular média; Er: eritrócitos totais; ARL: atividade respiratória de leucócitos; Lc: leucócitos totais; Tb: trombócitos totais; Mc: monócito; Lf: linfócito; Nt: neutrófilo; Eo: eosinófilo; CGE: célula granulocítica especial; LI: leucócitos imaturos; EN: eritrócito normal; Bb: núcleo com broto; Lb: núcleo lobado; Ntc: núcleo entalhado; MNU: micronúcleo

Figura 5. Biplot de GPA considerando as concentrações de metais na água e no sedimento, nos eritrócitos e no plasma e os biomarcadores medidos no eritrócito e plasma de *O. niloticus*, coletados em Alegre, Maemba ponto 1 e 2, e Carapebus

### CAPÍTULO III

---

**Figura 1.** A: Osmolalidade plasmática de *Oreochromis niloticus*, Concentração de íons no plasma de *Oreochromis niloticus*. **B:** íons Na<sup>+</sup>; **C:** íons K<sup>+</sup>; **D:** íons Cl<sup>-</sup>, coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n = 12). Diferentes letras significam diferença significativa entre Alegre e as lagoas (p < 0,05)

**Figura 2.** Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (A) e H<sup>+</sup>-ATPase (B) e anidrase carbônica (C) nas brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n=10). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas (p < 0.05)

**Figura. 3.** Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (A), H<sup>+</sup>-ATPase (B) e anidrase carbônica (C) nos rins de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n=10). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas (p < 0.05)

**Figura. 4.** Electronmicrografias de varredura da superfície epitelial do filamento das brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em (A) Alegre, (B) Maemba ponto1, (C) Maemba ponto2 e (D) Carapebus. Setas brancas indicam a superfície apical dos ionócitos. Barra de escala = 10 µm)

**Figura. 5.** A: Área fracional de ionócitos (AFI) na superfície epitelial do filamento das brânquias de *Oreochromis niloticus* e B: Densidade de ionócitos no filamento branquial, coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n=5, análise de 25 campos aleatórios). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas (p < 0.05)

**Figura 6.** Localização imunohistoquímica da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nos ionócitos (preto) nos filamentos e lamelas da branquias de *Oreochromis niloticus* coletados em (A) Alegre, (B) Maemba ponto1, (C) Maemba ponto2 e (D) Carapebus. Barra de escala = 20 µm

**Figura 7.** Ionócitos nos filamentos (F) e nas lamelas (L) das brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n=5, análise de 10 campos aleatórios). Diferentes letras, maiúsculas para filamento e minúsculas para lamela, indicam diferença significativa entre as lagoas (p < 0,05)

**Figura 8.** Localização imunohistoquímica da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nos ionócitos (preto) nos rins de *Oreochromis niloticus* coletados em (A) Alegre, (B) Maemba ponto1, (C) Maemba ponto2 e (D) Carapebus. Barra de escala = 20 µm

**Figura 9.** Área de ionócitos pela área de epitélio dos túbulos renais de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM (n=5, análise de 10 campos aleatórios). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas ( $p < 0,05$ )

**Figura 10.** Análise de componentes principais entre os parâmetros físicos e químicos da água e os biomarcadores no plasma (A) nas brânquias (B) e nos rins (C). Cond: condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ); Sal: salinidade ( $\text{‰}$ ); OD: oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ); Temp: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); Osm: osmolalidade; Na: íons  $\text{Na}^+$ ; K: íons  $\text{K}^+$ ; Cl: íons  $\text{Cl}^-$ ; I. Film: número de ionócito no filamento; I. Lam: número de ionócito na lamela; DI: densidade de ionócito; AFI: área fracional de ionócitos; NKA:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase; H.ATP:  $\text{H}^+$  - ATPase; A.C: anidrase carbônica; I. Rins: área de ionócitos por área dos túbulos renais. As lagoas A- Alegre, C – Carapebus, M1 – Maemba ponto 1, M2 – Maemba ponto 2

**Figura 11.** Análise de componentes principais entre os metais e os biomarcadores no plasma (A) nas brânquias (B) e nos rins (C). Osm: osmolalidade; Na: íons  $\text{Na}^+$ ; K: íons  $\text{K}^+$ ; Cl: íons  $\text{Cl}^-$ ; I. Film: número de ionócito no filamento; I. Lam: número de ionócito na lamela; DI: densidade de ionócito; AFI: área fracional de ionócitos; NKA:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase; H.ATP:  $\text{H}^+$  - ATPase; A.C: anidrase carbônica; I. Rim: área de ionócitos por área de epitélio renal. As lagoas A- Alegre, C – Carapebus, M1 – Maemba ponto 1, M2 – Maemba ponto 2

**Figura 12.** Biplot de GPA considerando os parâmetros físico-químicos, as concentrações de metais na água e no sedimento, no plasma, nas brânquias e nos rins, e os biomarcadores medidos no plasma, nas brânquias e nos rins de *O. niloticus*, coletados em Alegre, Maemba ponto 1 e 2, e Carapebus

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

---

**Tabela 1.** Parâmetros físicos e químicos da água (valores médios, mínimos e máximos) nas lagoas Alegre, Maemba (pontos 1 e 2) e Carapebus. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as lagoas ( $p < 0,05$ )

**Tabela 2.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) na água ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

**Tabela 3.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) no sedimento ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Tabela 4. Concentração de metais e metaloides (mediana e valores de 1º e 3º quartil) nos eritrócitos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) do sangue de *O. niloticus* coletado em Alegre (A) e nas lagoas do ponto Maemba1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ )

Tabela 5. Concentração de metais e metaloides (mediana e valores de 1º e 3º quartil) no plasma ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) do sangue de *O. niloticus* coletado em Alegre (A) e nas lagoas do ponto Maemba1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ )

**Tabela 6.** Variáveis hematológicas e imunológicas (média  $\pm$  SEM) do sangue de tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, coletadas nas lagoas Alegre, Maemba (pontos 1 e 2) e Carapebus. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e lagoas ( $p < 0,05$ )

### CAPÍTULO III

---

**Tabela 1.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) nas brânquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *O. niloticus* coletados em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ )

**Tabela 2.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) nos rins ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *O. niloticus* coletados em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ )

## SUMÁRIO

### **ORGANIZAÇÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO .....21**

#### CAPÍTULO I

---

---

<b>1. Introdução geral .....</b>	<b>23</b>
1.1 Tipos de contaminação .....	24
1.2 Estado do Espírito Santo – Brasil .....	25
1.2.1 Complexo de Tubarão e Ubu .....	26
1.2.2 Lagoas .....	27
1.3 Ecotoxicologia.....	28
1.4 Biomonitor.....	29
1.5 Biomarcadores.....	29
1.5.1 Biomarcadores hematológicos .....	29
1.5.2 Biomarcadores da regulação osmo-iônica .....	31
1.6 Influência dos parâmetros físico-químicos da água.....	33
1.7 Influência dos metais e nanopartículas metálicas.....	34
1.8 Tilápia-do-nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ):.....	34
1.9 Objetivo.....	36
1.9.1 Objetivos específicos .....	36
<b>Referências .....</b>	<b>37</b>

#### CAPÍTULO II

---

---

<b>1. Introdução.....</b>	<b>51</b>
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>52</b>
2.1. Área de estudo .....	52
2.2. Matrizes abióticas - Amostragem de água e sedimento .....	53
2.3. Matriz Biótica – Amostragem de peixes e sangue .....	54
2.4. Identificação e quantificação de metais em matrizes abióticas e bióticas .....	54
2.5. Variáveis hematológicas e imunológicas .....	55

2.6. Estresse fisiológico .....	56
2.8. Análise estatística .....	56
<b>3. Resultados .....</b>	<b>57</b>
3.1. Variáveis físico-químicas e concentração de metais em água e sedimentos .....	57
3.2. Fator de condição dos peixes ( <i>Kn</i> ) e metais e metaloides no sangue .....	60
3.3. Biomarcadores de estresse hematológicos, imunológicos, genotóxicos, mutagênicos e fisiológicos .....	63
3.4. Análise de Componentes Principais (PCA) .....	66
3.5. Correlação de Sperman .....	66
3.6. Análise discriminante linear (LDA) .....	68
3.7. Análise de procrustes generalizada (GPA) .....	68
<b>4. Discussão .....</b>	<b>69</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>75</b>
<b>Referências .....</b>	<b>76</b>

## CAPÍTULO III

---

<b>1. Introdução .....</b>	<b>87</b>
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>89</b>
2.1. Área de estudo .....	89
2.2. Coleta de água e sedimento: .....	90
2.3. Coleta de peixes e amostras biológicas: sangue, brânquia e rim .....	90
2.4. Análise Química .....	91
2.5. Osmolalidade e concentração de íons no plasma .....	91
2.6. Determinação da proteína total .....	92
2.7. Determinação da atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase e H <sup>+</sup> ATPase .....	92
2.8. Atividade da Anidrase Carbônica (AC) .....	92
2.9. Determinação da densidade e área fracional de ionócitos na superfície branquial .....	93
2.10. Imunohistóquímica contra a Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase nos ionócitos .....	93
2.11. Análise estatística .....	94
<b>3. Resultados .....</b>	<b>95</b>
3.1. Parâmetros físico-químicos da água e concentração de metais e metaloides na água e sedimento .....	95
3.2. Concentração de metais no plasma, brânquias e rins .....	95

3.3. Osmolalidade e concentração de íons no plasma .....	98
3.4. Atividade das ATPases e anidrase carbônica nas brânquias.....	98
3.5. Atividade das ATPases e anidrase carbônica nos rins.....	99
3.6. Densidade e área fracional de ionócitos (IFA) na superfície branquial .....	100
3.7. Imunohistóquímica de ionócitos.....	102
3.8. Análise de componentes principais (PCA).....	105
3.8.1 PCA - Parâmetros físico-químicos da água e os biomarcadores .....	105
3.8.2 PCA – Metais no plasma, nas brânquias e nos rins e os biomarcadores	106
3.9. Análise de correlação de Spearman ( $r_s < - 0.70$ e $r_s > 0.70$ ).....	108
3.10. Análise discriminante linear (LDA).....	108
3.11. Análise de procrustes generalizada (GPA).....	109
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>114</b>
<b>Referência.....</b>	<b>115</b>

#### CAPÍTULO IV

---

---

<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>121</b>
--------------------------------	------------

---

---

## ORGANIZAÇÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi estruturada em capítulos a fim de proporcionar melhor compreensão dos resultados e conclusões obtidos nesta pesquisa relacionada ao projeto de mestrado.

O capítulo I apresenta um panorama geral do assunto tratado neste trabalho, além de contar com a revisão bibliográfica dos principais temas e o contexto em que se insere essa pesquisa, também consta neste capítulo, os objetivos gerais e específicos que o trabalho procurou investigar e as referências citadas neste capítulo.

O capítulo II (hematologia e imunologia) e o capítulo III (mecanismos osmorreguladores) são as abordagens principais desta dissertação e foram divididas dessa forma com a finalidade de serem publicadas em periódicos específicos.

O capítulo IV traz as principais conclusões obtidas em todo o trabalho, unificando neste capítulo as conclusões das duas abordagens.

## CAPÍTULO I

---

### APRESENTAÇÃO

## 1. Introdução geral

Os corpos hídricos desempenham papel fundamental na sustentação da vida e na manutenção dos ecossistemas, fornecendo uma série de serviços ecossistêmicos. Entre esses serviços estão os habitats, que são cruciais para uma ampla variedade de espécies, oferecendo condições propícias para abrigo, alimentação e reprodução, e o equilíbrio dos ecossistemas, influenciando na regulação do clima, na manutenção da biodiversidade e no ciclo hidrológico. Além disso oferece o serviço de abastecimento de água potável, que é a fonte primária para consumo humano e essencial para os setores agrícola e industrial, e serviços recreativo e turístico, pois são locais de interesse para atividades como nado, pesca e observação da paisagem, contribuindo com a economia local.

Os corpos hídricos são classificados de acordo com suas características. Os oceanos e mares, por exemplo, são os maiores corpos hídricos do planeta, caracterizados por sua extensão, alta salinidade e profundidade variada, que incluem desde áreas rasas até abismos oceânicos profundos. Os rios e riachos são caracterizados por possuírem fluxo unidirecional, transportando água das áreas elevadas até as mais baixas, e são frequentemente utilizados para abastecimento de água, produção de energia e para o transporte. Os aquíferos são reservatórios de água subterrânea utilizados principalmente como fonte de abastecimento, e são bastante vulneráveis a poluição. Por sua vez, os pântanos e manguezais são ecossistemas úmidos de transição entre o ambiente aquático e terrestre, tendo sua salinidade variável de acordo com o nível de influência do mar e da água doce, desempenhando funções importantes no controle de inundações, na estabilização da costa e como habitat para diversas espécies. As lagoas e lagos, caracterizados pelas suas águas calmas, podem apresentar variados tamanhos e profundidades, e a depender da sua localização podem apresentar características de água doce ou de água salobra, sendo frequentemente usadas para recreação, pesca e abastecimento de água, além de atuar na regulação do clima local.

Apesar da sua importância, os corpos hídricos não se isentam das influências antrópicas. Conjuntamente com o crescimento populacional, que favorece o crescimento urbano acelerado e desordenado, ocorre a intensificação do

desenvolvimento dos setores agrícolas, industriais e tecnológicos para suprir as demandas da população. Os efeitos da poluição e contaminação dos corpos hídricos, provenientes das atividades antrópicas, representam estado de alerta, pois podem prejudicar o equilíbrio desse ecossistema e seu funcionamento, comprometendo os serviços ecossistêmicos prestados.

### 1.1 Tipos de contaminação

As fontes de contaminação dos ecossistemas aquáticos englobam efluentes domésticos, agrícolas e industriais, sendo que cada um possui características distintas e, conseqüentemente, possíveis efeitos distintos, que podem atuar de maneira antagônica ou sinérgica com os elementos e as substâncias contidas na água.

A poluição dos corpos hídricos pelo lançamento de efluentes domésticos, são resultantes das atividades diárias da população. Esses efluentes abrangem uma diversidade de subprodutos, tais como óleos, sabões, detergentes, produtos de higiene pessoal, medicamentos e dejetos orgânicos, como resto de alimentos e, em casos em que não há tratamento de esgoto adequado, excretas humanas (Schweitzer et al. 2018 e Afolalu et al. 2022).

A poluição originada na agricultura é causada pelas práticas agrícolas intensivas e pelo uso de pesticidas e fertilizantes químicos. Esses produtos podem contaminar tanto as águas subterrâneas quanto as superficiais através da lixiviação ou escoamento superficial (Obi et al., 2016). Os pesticidas, em particular, representam grande ameaça, pois se tratam de produtos que não são totalmente biodegradáveis, podendo se acumular nos corpos hídricos, resultando em disfunção ecológica e conseqüentemente gerando impactos negativos na biodiversidade (Nagendran, 2011).

A poluição dos recursos hídricos também pode ocorrer pelo lançamento de efluentes industriais. Neste caso, a composição das águas residuais de origem industrial varia de acordo com sua área de produção (Schweitzer et al, 2018 e Afolalu et al. 2022). Dessa forma, as águas residuais de indústrias produtoras de pesticida e herbicida terão em sua composição arsênio, nitratos e fosfatos, indústrias têxteis ou alimentícias terão a presença de corantes, e indústrias metalúrgicas terão

concentrações de diferentes metais e metaloides (du Plessis, 2020; Genawi et al., 2020). Além das águas residuais lançadas diretamente nas lagoas, existe a contaminação indireta pela emissão de material particulado atmosférico por essas indústrias.

O material particulado atmosférico (MPA) é o nome dado para a poeira presente na atmosfera, cuja composição pode variar dependendo da fonte emissora. Tal poeira pode ter diferentes origens, incluindo solo, queima de combustível veicular e atividades industriais. Devido o MPA ser composto por diferentes tamanhos de partículas, as menores e mais leves, normalmente inferiores a 10 µm tendem a ficar suspensas no ar, entretanto algumas partículas podem se agregar formando partículas maiores e mais pesadas dando origem ao MPA sedimentável (MPASe), que diferente das partículas menores e mais leves, tende a precipitar. Dessa forma, o MPA além de ser um contaminante atmosférico, ele pode se tornar um contaminante terrestre (Türtscher et al., 2017) e aquático (Arrivabene et al., 2015) na forma de MPASe. Entre os maiores emissores de MPA se destacam as indústrias metalúrgicas (Zhang et al., 2014), composto principalmente de elementos metálicos.

O impacto causado nos ecossistemas aquáticos pela deposição do MPASe metálico aumenta a concentração e a presença de diferentes metais e nanopartículas metálicas na água e podem comprometer as funções fisiológicas dos organismos aquáticos (Souza et al., 2018). Os metais e as nanopartículas metálicas, contidas no MPASe, podem se dissociar e se encontrar, livres ou complexadas, no ecossistema aquático, dessa forma, podendo ser incorporadas e bioacumuladas na biota residente (Adorno et al., 2023; Monteiro et al., 2023).

## 1.2 Estado do Espírito Santo – Brasil

O estado do Espírito Santo está localizado na região do litoral sudeste do Brasil, fazendo divisa com Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro. Sua capital é Vitória. A atual Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV), era chamada de Região Metropolitana de Vitória (RMV), mas teve seu título alterado quando ocorreu a incorporação dos municípios Guarapari e Fundão. Atualmente a Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV) é formada pelos municípios de Cariacica, Fundão,

Guarapari, Serra, Viana, Vila Velha e Vitória. Sendo o município de Serra o mais populoso, apesar de Vitória ser a capital do estado.

O clima do estado é tropical litorâneo úmido e as chuvas concentram-se no verão. Na economia, têm destaque a pecuária, a agricultura, se destacando a produção de cana-de-açúcar, de laranja e de café, e a mineração. Em 1966, a Companhia Vale do Rio Doce, a fim de ampliar a exportação de minério de ferro vindo de Minas Gerais, começou a construir o porto de Tubarão em Vitória, que foi finalizado em 1976. Com a instalação do porto de Tubarão surgiu o complexo industrial que possibilitava a pelotização do minério de ferro. Dessa forma, o estado do Espírito Santo se tornou o maior produtor de placas de aço do Brasil e um importante porto exportador de minério de ferro. O estado também apresenta importantes reservas de granito e mármore que são alvos do extrativismo para o setor de rochas ornamentais.

### 1.2.1 Complexo de Tubarão e Ubu

A RMGV é caracterizada pela atividade de indústrias metalúrgicas, envolvendo o processo de pelotização de minério de ferro e sua exportação (Abreu et al., 2017; Santos et al., 2017; Galvão et al., 2018), e são responsáveis pela emissão de MPASe, denominado pela população local como “pó preto”. O MPASe proveniente da atividade dessas indústrias é constituído por diferentes metais/metaloídes em concentrações distintas, sendo que a maior concentração é de Fe e Al (Souza et al., 2021 e Fortes et al., 2023), seguido de Ti, Mn e Zn, sendo que estes últimos podem variar a ordem, visto que a concentração dos metais não é fixa.

Os principais responsáveis pelo setor de mineração e siderurgia no Espírito Santo são o Complexo de Tubarão e Complexo de Ubu. O complexo de Tubarão, localizado em Serra – ES, é composto por várias unidades industriais, que por sua vez tem como principal foco a pelotização de minério de ferro e exportação. O complexo de Ubu está localizado em Anchieta – ES, tem como principal atividade a pelotização do minério de ferro para produção de aço. O minério de ferro é extraído pela unidade industrial localizada em Minas Gerais e é transportado como polpa de minério de ferro para a usina de pelotização no Espírito Santo através de um mineroduto. As atividades industriais tanto em Minas Gerais quanto em Espírito Santo tiveram suas atividades paralisadas devido ao desastre que ocorreu em Mariana - MG

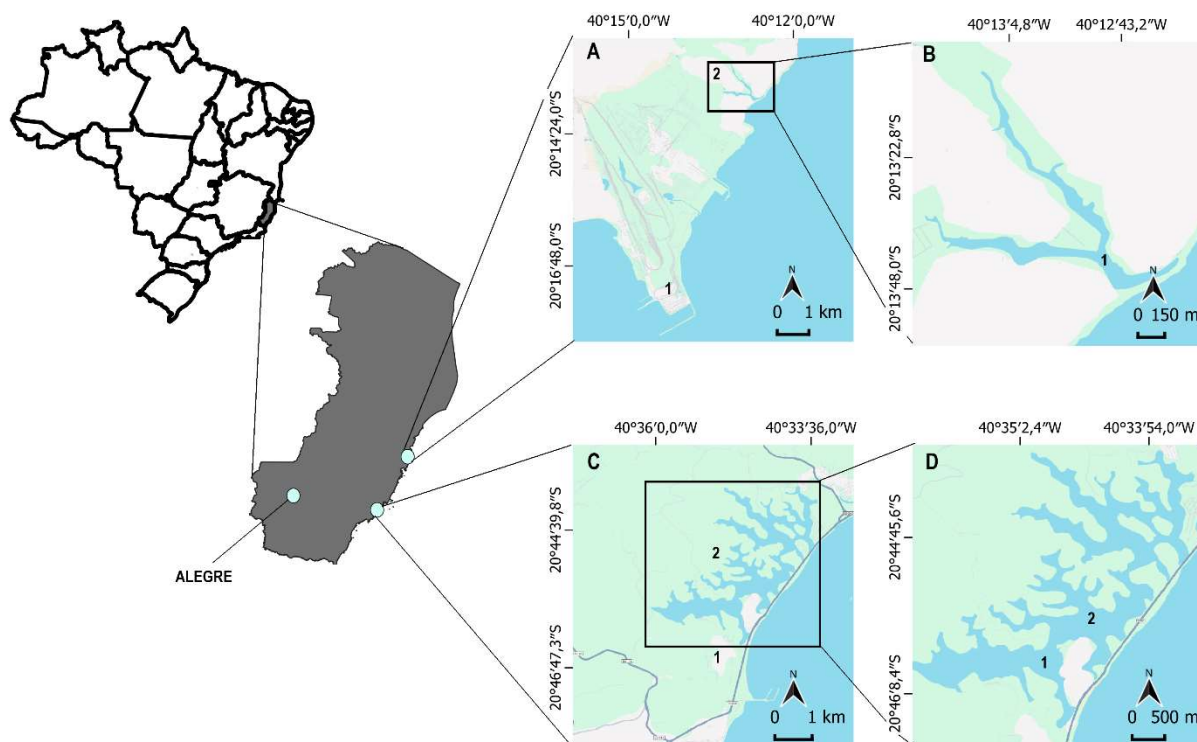
em 2015. Apesar dos resíduos do desastre não terem alcançado Anchieta - ES, suas atividades foram interrompidas, por se tratar da mesma empresa, e foram retomadas no final de 2020.

### 1.2.2 Lagoas

A Região Metropolitana da Grande Vitória é reconhecida não apenas pelas atividades industriais, mas também pela presença de várias lagoas que apresentam importância econômica. Entre elas, destacam-se as lagoas de Carapebus e Maemba, principalmente por se encontrarem próximas às atividades industriais (Fig. 1).

A lagoa Carapebus, inserida na Área de Proteção Ambiental de Praia Mole (criada em 1994), no município de Serra – ES, possui aproximadamente 0,4 km<sup>2</sup> de área e é utilizada principalmente para atividades recreativas e pesca. A lagoa é considerada salobra, pois apesar de ser separada do mar por uma faixa de areia, em épocas de pluviosidade mais elevada e marés altas, que ocorrem principalmente no verão, a faixa se rompe permitindo a conexão do mar com a lagoa. O clima da região tem como característica muita chuva no verão e seca no inverno. A ocupação urbana ao redor da lagoa aumentou consideravelmente com a instalação do complexo industrial, em 1976, o que resultou no aumento da sua exploração.

A lagoa Maemba (também chamada de Mãe-bá ou Maeba), localizada na divisa de Guarapari e Anchieta (Espírito Santo – Brasil), é a segunda maior lagoa do estado possuindo aproximadamente 4,9 km<sup>2</sup> de área e 1,9 m de profundidade. A lagoa tinha contato com o mar, entretanto, em meados de 1970, foi construída a pista da Rodovia do Sol, interditando o fluxo livre de água entre o mar e a lagoa. A lagoa é importante por ser habitat de várias populações de níveis tróficos diferentes, além disso, sua importância está atrelada aos serviços ecossistêmicos, como o abastecimento doméstico, a exploração de poços rasos pelas comunidades ribeirinhas, atuar como receptora e diluir os efluentes domésticos não tratados de algumas comunidades localizadas em seu entorno e como receptora de efluentes industriais, além de outras atividades, como a pesca e o lazer.



**Figura 1.** Estado do Espírito Santo, Brasil, indicando os 3 locais de coleta de *Oreochromis niloticus*, Alegre distante das indústrias metalúrgicas e as lagoas Maemba e Carapebus próximas das indústrias. A. Região correspondente ao Complexo de Tubarão (1) e Lagoa de Carapebus (2); B- Ponto de coleta na lagoa de Carapebus (1); C- Região correspondente à indústria metalúrgica (1) e lagoa Maemba (2); D- Ponto de coleta na lagoa da Maemba (pontos 1 e 2).

### 1.3 Ecotoxicologia

Como mencionado anteriormente, além das atividades das indústrias metalúrgicas, o estado do Espírito Santo também se destaca pela exploração das reservas de granito e mármore através do extrativismo, principalmente nos municípios de Castelo e Cachoeiro do Itapemirim que se localizam próximos ao município de Alegre, onde se encontra a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Sendo a ecotoxicologia o estudo dos efeitos adversos causados pela presença de substâncias químicas nos ecossistemas e consequentemente nas populações residentes. O Espírito Santo apresenta um cenário que desperta interesse para o âmbito ecotoxicológico, visto que existem organismos aquáticos nas lagoas próximas a essas atividades industriais que podem estar apresentando alterações fisiológicas causadas pela presença de substâncias provenientes dessas atividades ao seu redor.

A ecotoxicologia possibilita a identificação de possíveis substâncias químicas que representam risco tanto para a biota quanto para o ser humano, possibilitando a aplicação de medidas preventivas a fim de mitigar esses riscos (Magalhaes e Ferrão-Filho, 2008).

#### 1.4 Biomonitor

Os peixes são organismos vulneráveis aos impactos no ambiente aquático, pois não conseguem escapar dos efeitos dos compostos lançados (Authman, 2015). O uso de biomonitores, como os peixes, são fundamentais para mensurar a integridade ecológica frente a perturbações do meio. Essas perturbações podem resultar em alterações bioquímicas, fisiológicas, morfológicas ou comportamentais (Hayat et al., 2016), que podem ser utilizadas como biomarcadores para compreender os efeitos das perturbações ambientais nesses organismos aquáticos.

#### 1.5 Biomarcadores

Entende-se por biomarcadores as respostas biológicas que ocorrem quando há variação no estado normal de um organismo frente a alterações no ambiente (Walker, 1998). São instrumentos cruciais para monitorar alterações no ambiente que possam causar danos a fisiologia dos organismos.

##### 1.5.1 Biomarcadores hematológicos

As variáveis sanguíneas refletem o estado de saúde dos peixes frente às variações ambientais e do meio interno, uma vez que o sangue percorre todo o corpo e as substâncias absorvidas podem ser distribuídas para todos os tecidos e órgãos (Clauzet al., 2008, Campbell, 2015). Através de análises do plasma e de células sanguíneas, é possível obter um panorama geral da higidez de um organismo, da sua capacidade de transporte de oxigênio (Witeska, 2005), da resposta imunológica contra patógenos e infecções (Chen et al., 2002; Zanuzzo et al., 2014) e avaliar o estresse fisiológico (Odhiambo et al., 2020).

A oxigenação do sangue nos peixes está associada a capacidade de captar oxigênio dissolvido na água pelas brânquias e transportá-lo pelo sangue para os demais tecidos do corpo (Houston, 1997). O oxigênio é essencial para os processos metabólicos, portanto, a capacidade de oxigenação é determinante para a sobrevivência dos peixes. Os eritrócitos (glóbulos vermelhos) são as células sanguíneas responsáveis pelo transporte de oxigênio, entretanto é a hemoglobina, proteína presente nos eritrócitos, que possibilita esse transporte, pois é nela que o oxigênio dissolvido na água se liga (Houston, 1997). Portanto, alterações nos parâmetros sanguíneos, como variação na quantidade e volume dos eritrócitos ou na concentração e quantidade de hemoglobina, podem comprometer a capacidade de oxigenação do sangue (Ranzani-Paiva et al., 2004, Witeska, 2005). Esses parâmetros devem ser avaliados conjuntamente para se obter uma resposta abrangente sobre os efeitos de contaminantes nos mecanismos responsáveis pelo transporte de oxigênio no sangue.

A competência imunológica refere-se à capacidade que o sistema imunológico tem de reconhecer e defender o organismo de possíveis agentes patógenos ou de substâncias nocivas. É um importante indicador a ser analisado, pois pode oferecer informações sobre o ambiente em que o peixe se encontra exposto, através da sua ativação ou inibição. O sistema imunológico de peixes é dividido em inato (não específico) e adquirido (específico), sendo que geralmente a resposta inata precede a adquirida, ativando e determinando a natureza da resposta (Fearon, 1997). As principais células do sistema imune inato são os neutrófilos, que atuam principalmente na fagocitose de bactérias e são recrutados para locais de inflamação ou infecção, os monócitos, que são capazes de migrar para os tecidos, desempenhando papel importante na fagocitose de patógenos, os eosinófilos, que desenvolvem papel importante contra parasitas e respostas a alergia, os basófilos, que desempenham papel especialmente em quadros alérgicos, e os trombócitos, que atuam na coagulação sanguínea (Pádua et al., 2013, Corrêa et al. 2017). Por sua vez, a principal célula do sistema imune adquirido são os linfócitos, responsáveis pela identificação e destruição dos patógenos, na destruição dos patógenos, na produção de anticorpos e na memória imunológica. Estas células são auxiliadas por vários fatores imunológicos solúveis, como a enzima lisozima, que é capaz de romper a parede celular das bactérias, facilitando sua destruição (Paulsen et al., 2003).

Os biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados para verificar os efeitos da presença de xenobióticos no DNA e nos cromossomos, podendo gerar alterações nucleares dos eritrócitos, como núcleo em formato de ferradura ou com brotos, e células com micronúcleos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Frenzilli et al., 2009).

Os biomarcadores de estresse fisiológico são utilizados para avaliar o estresse em peixes através da observação dos níveis de cortisol plasmático, como resposta primária, e de glicose, como resposta secundária (Barton, 2000). O aumento dos níveis de cortisol está associado ao aumento dos níveis de glicose no sangue, o que pode resultar em hiperglicemia. Esse aumento é uma resposta fisiológica ao estresse, visto que o organismo busca aumentar a disponibilidade de energia para enfrentar situações desafiadoras, como forrageamento e fuga de predadores (Iwama, 1999).

#### 1.5.2 Biomarcadores da regulação osmo-iônica

Alterações na regulação iônica e balanço osmótico estão classificadas como biomarcadores fisiológicos, que refletem a perda e absorção de íons/água através das brânquias ou os efeitos na reabsorção e excreção de íons pelos rins (Stagg et al., 1992; Schlenk et al., 2008).

Em ambientes aquáticos, os peixes se deparam com gradientes iônicos e osmóticos variados, representando desafio para a manutenção da homeostase interna. A água doce possui baixa concentração de íons quando comparado ao meio interno do animal, induzindo nos peixes a perda de íons, através da difusão, e a absorção de água, por osmose (Dymowska et al., 2012, Hwang et al., 2014, Zimmer et al., 2022). Os teleósteos de água doce regulam o meio interno minimizando a ingestão de água (Robertson et al., 2014), reduzindo a permeabilidade do tegumento (Chasiostis et al., 2012) e excretando grandes volumes de urina hipotônica (Hwang et al., 2007). A combinação desses ajustes reduz o ganho de água e a perda difusa de íons (Chasiostis et al., 2012) e aumenta a capacidade de absorção de íons, como respostas à perda líquida de íons (Evans et al., 2005).

Os responsáveis por manter a homeostase interna de íons e água dos teleósteos são os órgãos osmorreguladores (Wendelaar Bonga e Lock, 2008; Hwang et al., 2011). As brânquias por exemplo, são predominantemente responsáveis pela

regulação osmótica e iônica, além de desempenharem funções nas trocas gasosas, no equilíbrio ácido-base e na excreção de resíduos de nitrogênio (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003; Evans et al., 2005; Shrivastava et al., 2019; Zimmer et al., 2022). Por ser o principal órgão em contato com a água se tornam suscetíveis à influência do pH do meio, da salinidade e da presença de xenobióticos (Fanta et al., 2003; Thophon et al., 2003; Atli et al., 2011). Os rins, conjuntamente com as brânquias, desempenham papel fundamental nos mecanismos osmorregulatórios em peixes de água doce (Breves et al., 2020). Os rins atuam como principal órgão excretor de água, e é importante para teleósteos de água doce devido aos mecanismos eficientes de reabsorção iônica, minimizando a perda de íons na excreção da água (Takvam et al., 2021; Pepe et al., 2022). Entretanto, em peixes de águas salobras, os rins atuam principalmente na reabsorção de água e secreção de íons divalentes, produzindo urina mais concentrada e, conseqüentemente, minimizando a excreção de água (Takvam et al., 2021).

As células especializadas pelas trocas iônicas são chamadas de ionócitos e estão presentes nos órgãos osmorreguladores. Essas células, também chamadas de células cloreto ou células ricas em mitocôndrias, desempenham um papel central no transporte de íons, utilizando enzimas do grupo ATPase, como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase, que por meio da hidrólise do ATP, liberam energia na forma de fosfato (Pi) e adenosina difosfato (ADP), a energia liberada por esse processo permite o transporte de íons contra o gradiente de concentração (Kultz e Somero, 1995; Fernandes et al., 2007). Além das ATPases, os ionócitos são ricos em atividade de anidrase carbônica, canais de  $\text{Na}^+$  e trocadores como  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ou  $\text{NH}_4^+$  (Evans et al., 2011, Hiroi e McCormick, 2012, Dymowska et al., 2012, Hwang et al., 2014, Evans et al., 2005). Esses componentes desempenham um papel fundamental na captação de íons como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$  bem como na captação e secreção de  $\text{HCO}_3^-$  e na secreção de  $\text{NH}_3$  em peixes de água doce (Evans et al., 1999; Fernandes et al., 2007). Características como a especificidade, localização (apical ou basolateral) e expressão relativa dessas enzimas nos ionócitos estão relacionadas diretamente à captação ou excreção de íons (Nebel et al., 2006), sendo fatores essenciais para a regulação osmótica e iônica dos organismos aquáticos.

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, presente na membrana basolateral dos ionócitos, atuam no transporte de íons  $\text{Na}^+$  para fora da célula e dos íons  $\text{K}^+$  para dentro da célula,

contribuindo para manter o potencial de membrana e regulação do volume celular (Bianchini et al., 1999; Sancho et al., 2003). A H<sup>+</sup>-ATPase atua na regulação do pH intracelular, bombeando prótons (íons de H<sup>+</sup>) para fora da célula.

Para identificar possíveis distúrbios fisiológicos ou morfológicos, causados por variações no meio aquático e pela presença de contaminantes, que podem afetar a regulação osmótica e iônica dos peixes, são necessário biomarcadores que indiquem alterações provenientes dessas alterações no meio aquático, como alterações no número e na área apical dos ionócitos, assim como sua localização nos órgãos osmorreguladores, ou até observar mudanças nas atividades enzimáticas mencionadas anteriormente.

#### 1.6 Influência dos parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água, tais como condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade, são importantes em estudos do ecossistema aquático devido à sua influência e interação com os contaminantes presentes (Liu et al., 2019). Esses parâmetros podem afetar a solubilidade, a mobilidade, a adsorção e a toxicidade dos contaminantes (Zhao et al., 2013; Chou et al., 2018), além de influenciar nos mecanismos fisiológicos dos organismos.

Por exemplo, a disponibilidade de oxigênio dissolvido é vital para a sobrevivência dos peixes, uma vez que o processo de respiração celular depende da captação de O<sub>2</sub> dissolvido, que por sua vez é essencial para desencadear as reações bioquímicas, envolvidas na produção de energia na forma de ATP, para possibilitar as atividades metabólicas do peixe. No caso da variação de temperatura a influência ocorre principalmente no aumento ou diminuição da taxa metabólica, afetando os processos fisiológicos do peixe (Mauvault et al., 2017). Variações no pH ou na salinidade podem afetar o equilíbrio osmótico e iônico dos peixes, afetando sua capacidade de regular os fluidos corporais (Laurent et al., 2000, Lisboa et al., 2015).

Dessa forma, a análise dos parâmetros físico-químicos da água e sua relação com os contaminantes são essenciais para compreender o cenário e as possíveis influências que os peixes estão enfrentando e como isso pode estar afetando sua higidez.

## 1.7 Influência dos metais e nanopartículas metálicas

A avaliação da bioacumulação de metais e nanopartículas metálicas em organismos aquáticos permite a identificação de espécies com maior sensibilidade a eles, assim como permite entender os possíveis distúrbios estruturais e funcionais provenientes da bioacumulação (Wood et al., 2012a, Wood et al., 2012b). As enzimas responsáveis pelo equilíbrio iônico podem ter sua função alterada devido a presença de poluentes ambientais, incluindo os íons metálicos (Canli e Stagg, 1996, Jang et al., 2014, Zhang et al., 2015, Mansouri et al., 2016, Canli e Canli, 2019), e as nanopartículas metálicas ao se acumularem nos tecidos podem influenciar em diferentes sistemas metabólicos (Osborne et al., 2015, Adam et al., 2015, Hoseini et al., 2016, Canli e Canli, 2020).

O nível de comprometimento da atividade dessas enzimas depende do tipo de metal e de sua concentração, das características fisiológicas do peixe, que podem variar de espécie para espécie, sendo algumas mais sensíveis que outras, e dos parâmetros físico-químicos da água que podem influenciar na especiação dos metais e nanopartículas metálicas (Heath, 1995).

## 1.8 Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*):

Os peixes do gênero *Oreochromis* (Tilápia) são considerados como modelos para estudos ambientais pois podem ser contaminados via água durante o processo respiratório e via sedimento, uma vez que forrageiam o fundo dos corpos hídricos por comida. São relevantes por sua resistência às alterações ambientais e à exposição a poluentes o que implica em alta capacidade para efetuar ajustes dos processos orgânicos frente aos desafios ambientais. Dessa maneira, seria necessário condições extremas para que atingissem os níveis letais de exposição a esse gênero de peixe (Cioni et al., 1991; Kamal e Mair, 2005). Segundo Popma e Masser (1999), o gênero apresenta uma morfologia lateralmente comprimida, com uma longa nadadeira dorsal que possui espinhos na parte anterior, além das nadadeiras pélvica e anal.

A tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma espécie dulcícola, possui dieta diversificada, incluindo ingestão de plantas, de detritos (matéria orgânica em decomposição) e de organismos planctônicos, entretanto há relatos de que essa espécie pode consumir ovos, larvas de outros peixes e peixes menores (Canónico et

al., 2005). A espécie é originária da África e do sudoeste do Oriente, entretanto, devido suas características, como tolerância às alterações ambientais (Fernandes e Rantin, 1986a, b, 1987, 1989, 1994; Soares et al., 2022; De Angelis et al., 2023; Fortes et al., 2023) e ciclo reprodutivo curto, a espécie se dispersou mundialmente, sendo introduzida no Brasil em 1970 (Pinheiro et al., 2006). No Brasil, se tornou a espécie mais cultivada devido ao custo/benefício para a aquicultura (Silva et al., 2015), e são importante fonte de renda para pescadores artesanais e fonte de proteína para os humanos (Seriani et al., 2012).

Classificação sistemática da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), segundo Trewavas (1983):



**Figura 2:** *Oreochromis niloticus*, Tilápia-do-nilo. (Foto: Museu Nacional)

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Sub-Família: Pseudocrenilabrinae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

### 1.9 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a saúde dos peixes, utilizando de biomarcadores sanguíneos, imunohistoquímicos, morfológicos e bioquímicos, e investigar se os peixes coletados nas lagoas próximas as atividades metalúrgicas têm a higidez mais comprometida devido as influências antrópicas ao seu redor em comparação com os peixes de região com ausência dessas indústrias (Alegre).

#### 1.9.1 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químicos das lagoas (Maemba e Carapebus) e Alegre;
- Avaliar a concentração de metais na água e sedimento das lagoas (Maemba e Carapebus) e Alegre;
- Determinar a concentração de metais no sangue (eritrócitos e plasma), nas brânquias e rins de *O. niloticus* coletados;
- Avaliar biomarcadores hematológicos, imunológicos e nível de estresse fisiológico de *O. niloticus*;
- Avaliar biomarcadores da regulação iônica das brânquias e rins de *O. niloticus*.

## Referências

- ABREU, L.D., COSTA, J.G., ABREU, G.C., MORIMOTO, T.. 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. 2017
- ADAM, N., SCHMITT, C., DE BRUYN, L., KNAPEN, D., BLUST, R.. Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. **Science of The Total Environment**. 526, 233–242, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.064>
- ADORNO, H.A., SOUZA, I.C., MONFERRÁN, M.V., WUNDERLIN, D.A., FERNANDES, M.N., MONTEIRO, D.A.. 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**. 856, 159–168, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159168>
- AFOLALU, S.A., IKUMAPAYI, O.M., OGEDENGBE, T.S., KAZEEM, R.A., OGUNDIPE, A.T.. Waste pollution, wastewater and effluent treatment methods—an overview. **Materialstoday: Proceedings**. 62, 3282-3288, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.231>
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. 343:121–135, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)
- ATLI, G.; CANLI, M. Essential metal (Cu, Zn) exposures the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20, 1861–1869, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0724-z>
- AUTHMAN, M. M. Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 06, n. 04, 2015. Doi: 10.4172/2155-9546.1000328
- BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C.E.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; BRINN, R.P.; ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**. 34, 405–412, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9200-y>
- BALDISSEROTTO, B. Water pH and hardness affect growth of freshwater teleosts. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 40, 138–144, 2011.
- BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0012:SFDITC>2.0.CO;2)
- BAYSOY, E., ATLI, G., CANLI, M.. The effects of salinity and salinity+ metal (chromium and lead) exposure on ATPase activity in the gill and intestine of tilapia *Oreochromis*

*niloticus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 64, 291–300, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9825-9>

BIANCHINI, A.P.; CARVALHO DE CASTILHO, P. Effect of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1951 (Decapoda-Grapsidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 62, 63–69, 1999. <https://doi.org/10.1007/s001289900842>

BOLNER, K.C.S.; BALDISSEROTTO, B. Water pH and urinary excretion in silver catfish *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**. 70, 50–64, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01253.x>

BREVES, J.P.; STARLING, J.A.; POPOVSKI, C.M.; DOUD, J.M.; TIPSMARK, C.K. Salinity-dependent expression of *ncc2* in opercular epithelium and gill of mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Journal of Comparative Physiology B**. 190, 219–230, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01260-x>

BURY, N.R.. The changes to apical silver membrane uptake, and basolateral membrane silver export in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on exposure to sublethal silver concentrations. **Aquatic Toxicology**. 72, 135–145, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.014>

CAMPBELL, T.W. Exotic Animal: Hematology and Cytology, 4a. **Wiley Blackwell**. 2015. Doi: 10.1002/9781118993705

CANLI, M., STAGG, R.M.. The effects of in vivo exposure to cadmium, copper and zinc on the activities of gill ATPases in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 31 (4), 494–501, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00212433>

CANLI, E.G., CANLI, M.. Nanoparticles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>) decrease ATPase activity in the osmoregulatory organs of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*); histopathological investigations of tissues by transmission electron microscope. **EC Pharmacol. Toxicol.** 7, 909–924, 2019. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3506158>

CANLI, E.G., CANLI, M.. Investigations of the nervous system biomarkers in the brain and muscle of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following accumulation of nanoparticles in the tissues. **Turkish Journal of Zoology**. 44, 90–103, 2020. <https://doi.org/10.3906/zoo-1912-11>

CANONICO, G., ARTHINGTON, A., MCCRARY, J., THIEME, M.. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**. 15, 463–483, 2005. <https://doi.org/10.1002/aqc.699>

CIONI, C., MERICH, D., CATALDI, E., CATAUDELLA, S.. Fine structure of chloride cells in freshwater- and seawater-adapted *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Journal of Fish Biology**. 39 (2), 197–209, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb04356.x>

CHASIOSTIS, H.; KOLOROV, D.; BUI, P.; KELLY, S.P. Tight junctions, tight junction proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: A review. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. 184, 282–292, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.020>

CHEN WH, SUN LT, TSAI CL, SONG YL, CHANG CF. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. **General and Comparative Endocrinology**. 126 (1), 90-100, 2002. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7772>

CHOU, PING-I & NG, DING-QUAN & LI, I-CHIA & LIN, YI-PIN. Effects of dissolved oxygen, pH, salinity and humic acid on the release of metal ions from PbS, CuS and ZnS during a simulated storm event. **Science of the Total Environment**. 624, 1401-1410, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.221>

CLAUSS, TM; POMBA, ADM; ARNOLD, JE.. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**., 11, 445-462, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>

CORRÊA, S. A. DA S., ABESSA, D. M. DE S., SANTOS, L. G. DOS, DA SILVA, E. B., & SERIANI, R.. Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 99(3), 482–491, 2016. <https://doi.org/10.1080/02772248.2016.1189554>

DE ANGELIS, C.F., SOARES, M.P., MCKENZIE, D.J., TAYLOR, E.W., CARDOSO, I.L., SOUZA, I.C., WUNDERLIN, D.A., MONFERRÁN, M.V., FERNANDES, M.N., LEITE, C. A. C.. Settleable atmospheric particulate matter affects the swimming performance and aerobic metabolic rate of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 271, 109696, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109696>

DOGAN, A., CANLI, M.. Investigations on the osmoregulation system of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to mercury in differing salinities. **Turk. J. Fish. Aquat. Sci.** 19 (12), 1061–1068, 2019. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19\\_12\\_08](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_12_08)

DU PLESSIS A., Freshwater and Industries, in: M.I. Goldstein, D.A. DellaSala (Eds.), **Encyclopedia of the World's Biomes**, Elsevier, pp. 55–62, 2020.

DYMOWSKA, A.K.; HWANG, P.P.; GOSS, G.G. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 184, 282–292, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.025>

EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M., POTTS, W.T.W.. Ionic transport in the fish gill epithelium. **Journal of Experimental Zoology** 283, 641–652, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990601\)283:7<641::AID-JEZ3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990601)283:7<641::AID-JEZ3>3.0.CO;2-W)

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of

nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, 85, 97–177, 2005. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>

EVANS, D.H. Freshwater fish gill ion transport: August Krogh to morpholinos and microprobes. **Acta Physiologica**, 202, 349–359, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02186.x>

FANTA, E., RIOS, F.S., ROMÃO, S., VIANNA, A.C.C., FREIBERGER, S.. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**., 54: 119-130, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00044-1)

FEARON, D. T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**, v. 388, p. 323-324, 1997. <https://doi.org/10.1038/40967>

FERNANDES, M.N., MORON, S.E., SAKURAGUI, M.M.. Gill morphological adjustments to environment and gas exchange function in: Fernandes, MN., Rantin, F.T., Glass, M.L., Kapoor, B.G. (Eds.), **Fish Respiration and Environment Science Publishers**, New Hampshire, pp. 93-120, 2007.

FERNANDES, M.N., Mazon, A.F.. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L., Kapoor, B.G. (Eds.). **Fish adaptations**. Enfield: Science Publishers, 418p, 2003.

FERNANDES, M. N., Rantin, F. T.. Lethal temperatures of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 46(3): 589-595, 1986a.

FERNANDES, M. N., Rantin, F. T.. Thermal acclimation of *Oreochromis niloticus* (L.). Teleostei, Cichlidae. **Rev. d'Hydrobiol. Trop.**, 19 (3-4): 163-168, 1986b.

FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T.. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental reductions of dissolved oxygen. **Boletim de fisiologia animal**, USP, 11: 51-60, 1987.

FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T.. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia, under different thermal conditions. **Journal of Fish Biology**, 35(4): 509-519, 1989. doi: 10.1111/j.1095-8649.1989.tb03002.x

FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T.. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Aquaculture consequences. **Aquaculture**, 127: 339 – 346, 1994. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90236-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90236-4)

FREDA, J.; MCDONALD, D.G. Physiological correlates of interspecific variation in acid tolerance in fish. **Journal of Experimental Biology**, 136, 243–258, 1998. <https://doi.org/10.1242/jeb.136.1.243>

FRENZILLI G.; NIGRO M.; LYONS, B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research* 681:80–92, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>

FORTES, W.M.P.A., SOUZA, I.C., AZEVEDO, V.C., GRIBOFF, J., MONFERRÁN, M.V., WUNDERLIN, D.A., MATSUMOTO, S.T., FERNANDES, M.N.. Metal/metalloid bioconcentration dynamics in fish and the risk to human health due to water contamination with atmospheric particulate matter from a metallurgical industrial area. **Science of The Total Environment**. 1; 902: 166119, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166119>

GALVÃO, E.S., SANTOS, J.M., LIMA, A.T., REIS JR., N.C., STUETZ, R.M., ORLANDO, M.T.D.. Resonant Synchrotron X-ray diffraction determines markers for iron-rich atmospheric particulate matter in urban region. **Chemosphere** 212, 418–428, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.111>

GENAWI, N., IBRAHIM, M., EL-NAAS, M. ALSHAIK, A.. Chromium Removal from Tannery Wastewater by Electrocoagulation: Optimization and Sludge Characterization. **Water**. 12. 1374, 2020. <https://doi.org/10.3390/w12051374>

HAYAT, N.M., SHAMAAN, N.A., SABULLAH, M.K., SHUKOR, M.Y., SYED, M.A., KHALID, A., DAHALAN, F.A., AHMAD, S.A.. The use of Lates calcarifer as a biomarker for heavy metals detection. **Rendiconti Lincei** 27, 463–472, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0501-7>

HANDY, R.D., VON DER KAMMER, F., LEAD, J.R., HASSELLOV, " M., OWEN, R., CRANE, M.. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology** 17 (4), 287–314, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0199-8>

HEATH, A.G.. **Water Pollution and Fish Physiology**, 2nd ed. CRC Press, New York, NY, USA, 1995.

HOSEINI, S.M., HEDAYATI, A., TAHERI MIRGHAED, A., GHELICHPOUR, M.. Toxic effects of copper sulfate and copper nanoparticles on minerals, enzymes, thyroid hormones and protein fractions of plasma and histopathology in common carp *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicologic Pathology** 68, 493–503, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.08.002>

HIROI, J., MCCORMICK, S.D.. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish. **Respiratory Physiology & Neurobiology** 184, 257– 268, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.07.019>

HOUSTON, A. H. Review: Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health?. In: **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, n. 6, p. 879-894, 1997. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1997\)126<0879:RATCHV>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1997)126<0879:RATCHV>2.3.CO;2)

HWANG, P.P.; LEE, T.H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, 479-497, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.416>

HWANG, P.P.; LEE, T.H.; LIN, L.Y. Ion regulation in fish gills: Recent progresses in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 301, 28–47, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00047.2011>

HWANG, P.P.; LIN, L.Y. Gill ion transport, acid-base regulation and nitrogen excretion. In **The Physiology of Fishes**, 4th ed.; Evans, D.H., Claiborne, J.B., Currie, S., Eds.; CRC: Boca Raton, FL, USA, pp. 205–233, 2014.

IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M.M.; FORSYTH, R.B.; ACKERMAN, P.A.. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, v. 39, n. 6, p. 901-909, 1999. <https://doi.org/10.1093/icb/39.6.901>

JANG, M.H., KIM, W.K., LEE, S.K., HENRY, T.B., PARK, J.W.. Uptake, tissue distribution, and depuration of total silver in common carp (*Cyprinus carpio*) after aqueous exposure to silver nanoparticles. **Environ. Sci. Technol.** 48, 11568–11574, 2014. <https://doi.org/10.1021/es5022813>

KAMAL, A.H.M.M., MAIR, G.C.. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. **Aquaculture** 247, 189–201, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.008>

KULAC, B., ATLI, G., CANLI, M.. Investigations on the ATPase activities and cadmium uptake in freshwater fish *Oreochromis niloticus* following exposures to cadmium in increased salinity. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 12 (4), 861–869, 2012. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v1241\\_14](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v1241_14)

KULTZ, D.; SOMERO, G.N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*, **Journal of Experimental Biology**, 98, 1883–1894, 1995. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.9.1883>

LAURENT, P., WILKIE, M.P., CHEVALIER, C., WOOD, C.M.. The effect of highly alkaline water (pH 9.5) on the morphology and morphometry of chloride cells and pavement cells in the gills of the freshwater rainbow trout: relationship to ionic transport and ammonia excretion. **Canadian Journal of Zoology**. 78 (2): 307-319, 2000. <https://doi.org/10.1139/z99-207>

LINNAEUS, C. V. et al. *Systema naturae*, vol. 1. **Systema naturae, Vol. 1**, 1758.

LISBOA, V. BARCAROLLI, I., SAMPAIO, L., BIANCHINI, A.. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). **Neotropical Ichthyology**. 13. 447-452, 2015. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140122>

LIU, J.-J., DIAO, Z.-H., XU, X.-R., & XIE, Q.. Effects of dissolved oxygen, salinity, nitrogen and phosphorus on the release of heavy metals from coastal sediments. **Science of The Total Environment** 20; 666: 894-901, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.288>

MAGALHAES, D.P. E FERRÃO-FILHO, A.S.. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. 12: 355-381, 2008. ISSN: 1980-6442

MAULVAULT AL, BARBOSA V, ALVES R, CUSTÓDIO A, ANACLETO P, REPOLHO T, POUÇÃO FERREIRA P, ROSA R, MARQUES A, DINIZ M. Ecophysiological responses of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to increased temperature and dietary methylmercury. **Science of The Total Environment**. 15;586: 551-558, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.016>

MANSOURI, B., MALEKI, A., JOHARI, S.A., SHAHMORADI, B., MOHAMMADI, E., SHAHSAVARI, S., DAVARI, B.. Copper bioaccumulation and depuration in common carp (*Cyprinus carpio*) following co-exposure to TiO<sub>2</sub> and CuO nanoparticles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 71 (4), 541–552, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0313-5>

MCGEER, J.C.; WOOD, C.M.. Protective effects of water Cl<sup>-</sup> on physiological responses to waterborne silver in rainbow trout. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 55(11):2447–2454, 1998. <https://doi.org/10.1139/f98-133>

MONTEIRO R., SOUZA, I.C., MOROZESK, M., SOARES, M.P., DE ANGELIS, C.F., VIEIRA, N.S., BENDHACK, F., MONFERRÁN, M.V., WUNDERLIN, D.A., FERNANDES, M.N.. Metalliferous atmospheric settleable particulate matter action on the fat snook fish (*Centropomus parallelus*): Metal bioaccumulation, antioxidant responses and histological changes in gills, hepatopancreas and kidneys. **Chemosphere**, 330, 138715, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138715>

NAGENDRAN R., Agricultural Waste and Pollution, **Waste** pp. 341–355, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381475-3.10024-5>

NEBEL, C.L.; BOULO, V.; BODINIER, C.; CHARMANTIER, G. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: Involvement in osmoregulation. **Journal Experimental Biology**, 209, 4908–4922, 2006. <https://doi.org/10.1242/jeb.02591>

OBI F., UGWUISHIWU B., NWAKAIRE J., Agricultural waste concept, generation, utilization and management. **Nigerian Journal of Technology** 35 (4) 957, 2016. <https://doi.org/10.4314/njt.v35i4.34>

ODHIAMBO, E.; ANGIENDA, P.; KIRSTEEN, D.R. O.; ONYANGO, D.. Stocking density induced stress on plasma cortisol and whole blood glucose concentration in Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) of Lake Victoria, Kenya. **International Journal of Zoology** 1-8, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9395268>

OSBORNE, O.J.; LIN, S.; CHANG, C.H.; JI, Z.; YU, X.; WANG, X.; LIN, S.; XIA, T.; NEL, A.E.. Organ-specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish. **ACS Nano** 9, 9573–9584, 2015. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04583>

PÁDUA, S., RANZANI PAIVA, M., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M.. **Métodos para Análise Hematológica em Peixes**, 2013.

PAULSEN, S.M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish & Shellfish Immunology** 14(1):39-54, 2007. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0416>

PARRA, J.E.G.; BALDISSEROTTO, B. Effect of water pH and hardness on survival and growth of freshwater teleosts. In **Fish Osmoregulation**; Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G., Eds.; Science Publishers: Boca Raton, FL, USA; pp. 135–150, 2007.

PEPE N, CANLI EG, CANLI M. Salinity and/or nanoparticles ( $Al_2O_3$ ,  $TiO_2$ ) affect metal accumulation and ATPase activity in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology** 94:103931, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103931>

PINHEIRO, L. M.S.; PINHEIRO, L. E. L.; MARTINS, R. T.. Aspectos técnicos da tilapicultura. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 50, p. 75-80, 2006.

POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V.. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, c.30, p.339-352, 1994.

POPMA, T.; MASSER, M. **Tilapia life history and biology**. 1999.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, p. 89-120, 2004. ISBN-10: 8585519746

ROBERTSON, L.M.; WOOD, C.M.. Measuring gill paracellular permeability with polyethylene glycol-4000 in freely swimming trout: Proof of principle. **Journal of Experimental Biology**, 217, 1425–1429, 2014. <https://doi.org/10.1242/jeb.099879>

SANCHO, E.; FERNANDEZ-VEJA, C.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E.. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 56:434–441, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00077-0)

SANTOS, J.M.; REIS JR.; N.C.; GALVÃO, E.S.; SILVEIRA, A.; GOULART, E.V.; LIMA, A.T.. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**. 24, 22026–22039, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9677-y>

SERIANI, R.; ABESSA, D.M.S.; KIRSCHBAUM, A.A.; PEREIRA, C.D.S.; ROMANO, P.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.. Relationship between water toxicity and hematological changes in *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology** 15:47–53. 2012. DOI: 10.14210/bjast.v15n2.p47-53

SHRIVASTAVA, J.; NDUGWA, M.; CANEOS, W.; BOECK, G. Physiological trade-offs, acid-base balance and ion-osmoregulatory plasticity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles under complex scenarios of salinity variation, ocean acidification and high ammonia challenge. **Aquatic Toxicology** 212, 54–69, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.024>

SILVA, G.F.; MACIEL, L.M.; DALMASS, M.V.; GONÇALVEZ, M.T.. **Tilápia-do-nilo - Criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná Curitiba**. 292. 2015. ISBN: 978-85-60930-074

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.. Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 161, 260-269, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.068>

SOARES, M. P; DE ANGELIS, C. F; CARDOSO, I. L.; MCKENZIE, D.J.; SOUZA, I.S.; WUNDERLIN, D.A.; MONFERRÁN, M.V.; FERNANDES, M.N; LEITE, C.A.C. Setttable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative biochemistry and physiology c-toxicology & pharmacology**, v. 00, p. 109330, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330>

SCHLENK, D.; HANDY, R.; STEINERT, S.; DEPLEDGE, M.H.; BENSON, W.. Biomarkers. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D. **The toxicology of fishes**. Boca Raton: CRC Press. 683-731, 2008. <https://doi.org/10.1201/9780203647295>

SCHWEITZER, L.; NOBLET, J.. Water Contamination and Pollution. **Green Chemistry** pp. 261–290, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00011-X>.

STAGG, R.; GOKSOYR, A.; RODGER, G.. Changes in branchial Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, metallothionein and P450 1A1 in dab *Limanda limanda* in the German bight: indicators of sediment contamination? **Marine Ecology Progress Series** 91, 105–115, 1992.

TAKVAM, M.; WOOD, C.M.; KRYVI, H.; NILSEN, T.O. Ion transporters and osmoregulation in the kidney of teleost fishes as a function of salinity. **Front. Physiol.** 12, 664-588, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.664588>

THOMPSON, W.A.; RODELA, T.M.; RICHARDS, J.G. The effects of strain and ploidy on the physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to pH 9.5 exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 183, 22–29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.12.005>

THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S.. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure, **Environmental Pollution**, 121: 307-320, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00270-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00270-1)

TREWAVAS, E. Tilapia: taxonomy and speciation [in Africa]. In: **International Conference on the Biology and Culture of Tilapias, Bellagio (Italy), 2-5 Sep 1980**. 1982.

WALKER, C.H. Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. **Environmental Health Perspectives** 106: 613–620, 1998. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106613>

WENDELAAR-BONGA, S.E.W.; LOCK, R.A.C.. The osmoregulatory system. In: Di 108 Giulio, R.T., Hinton, D. **The toxicology of fishes**. Boca Raton: CRC Press. 401-415, 2008. <https://doi.org/10.1201/9780203647295>

WITESKA, M. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. **Electronic Journal of Ichthyology**, July 1:35–41. 2005.

WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts: Organs; Schlenk, D., Benson, W.H., Eds.; Taylor & Francis: New York, NY, USA, 1, 33–37, 2001. ISBN: 9781315109244

WOOD, C.M.; FARREL, A.P.; BRAUNER, C.J.. Homeostasis and toxicology of essential metals. **Fish Physiology** 31A. Academic Press,, London, p. 497, 2012a. ISBN: 9780123786357

WOOD, C.M.; FARREL, A.P.; BRAUNER, C.J.. Homeostasis and toxicology of nonessential metals. **Fish Physiology** 31B. Academic Press, London, p. 507, 2012b. ISBN: 9780123786357

WRIGHT, P.A.; WOOD, C.M.. Seven things fish know about ammonia and we don't. **Respiratory Physiology & Neurobiology** 184, 231–240, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.07.003>

YESAKI, T.; IWAMA, G.K.. Survival, acid-base regulation, ion regulation and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline hard water. **Physiological Zoology** 65, 763–787, 1992. <https://doi.org/10.1086/physzool.65.4.30158538>

ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C.; RISE, M.L.; HALL, J.R.; NASH, G.W.; GAMPERL, A.K.. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture** 435, 1–9. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.010>

ZHANG, Y.; ZHU, L.; ZHOU, Y.; CHEN, J.. Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. **Journal of Environmental Sciences** 30, 223–230, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.024>.

ZHANG, S.; WORRELL, E.; CRIJNS-GRAUS, W.; WAGNER, F.; COFALA, J.. Co-benefits of energy efficiency improvement and air pollution abatement in the Chinese iron and steel industry. **Energy** 78, 333–345, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.10.018>

ZHAO, S.; FENG, C.; WANG, D.; LIU, Y.; E SHEN, Z.. Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: Relative role of sediments' properties and metal speciation. **Chemosphere**, 91(7), 977–984, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.001>

ZIMMER, A.M.; PERRY, S.F. Physiology and aquaculture: A review of ion and acid-base regulation by the gills of fishes. **Fish and Fisheries**. 23, 874–898, 2022. <https://doi.org/10.1111/faf.12659>

## CAPÍTULO II

---

### ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS

MÚLTIPLOS BIOMARCADORES SANGUÍNEOS PARA AVALIAR A SAÚDE DE  
PEIXES QUE HABITAM LAGOAS PRÓXIMAS A INDÚSTRIAS METALÚRGICAS -  
ESPÍRITO SANTO, BRASIL

Luana B Carvalho <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais - PPGERN

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas - DCF

## Resumo

A atividade antropogênica combinada com atividades industriais vem influenciando os ecossistemas aquáticos. O Brasil se destaca por ser um dos maiores produtores e exportadores de minério de ferro e ligas metálicas, possuindo um dos maiores complexos metalúrgicos no estado do Espírito Santo, o Complexo de Tubarão e Ubu. Este estudo teve como objetivo avaliar o sangue de *Oreochromis niloticus* coletados em lagoas costeiras influenciadas por atividades metalúrgicas (Maemba e Carapebus) e em um sistema de aquicultura (Alegre) localizado no Instituto Federal do Espírito Santo, distante de indústrias metalúrgicas. Água e sedimento das lagoas foram analisados quanto a presença e concentração de metais, e multibiomarcadores (hematológicos, imunológico e fisiológico, genotoxicidade e mutagenicidade) foram analisados no sangue (plasma e células) para avaliar a higidez do animal. Os parâmetros físico-químicos da água influenciam o ecossistema dessas lagoas e influenciam a disponibilidade de metais. A análise dos componentes principais separou Alegre das demais lagoas, influenciadas por resíduos de indústrias metalúrgicas, o que se refletiu nos biomarcadores. Apesar da água e sedimento de Alegre apresentarem as maiores concentrações de metais, as concentrações de metais no sangue dos peixes de Alegre foram menores comparados com o dos peixes coletados em Maemba e Carapebus. Os peixes da lagoa Maemba M1 apresentaram quadro de anemia e os peixes da lagoa Carapebus apresentaram maior percentual de micronúcleos, sugerindo a presença de agentes genotóxicos na água ou sedimento. Comparando as lagoas, foi possível observar alterações mais acentuada nos peixes coletados em lagoas próximas às atividades metalúrgicas. O presente estudo confirma a hipótese de que os peixes localizados em lagoas próximas a centros urbanos e indústrias metalúrgicas são influenciados por seus efluentes e contaminantes do seu entorno. O uso de múltiplos biomarcadores se fez essencial para avaliar a saúde dos peixes e compreender as diferentes influências que possam estar comprometendo a qualidade desses corpos hídricos.

**Palavras-chave:** Metalurgia. Metais/Metaloides. Hematologia. Genotoxicidade. Imunologia inata. Estresse fisiológico.

## 1. Introdução

O aumento dos efluentes domésticos, da emissão de gases de efeito estufa e de outros poluentes se deve à urbanização, ao aumento do tráfego de veículos e às atividades industriais cujos resíduos afetam o meio ambiente e os recursos hídricos, contaminando-os (Souza et al., 2013; Baptista Ventura, et al., 2020). Além disso, as indústrias metalúrgicas liberam na atmosfera aerossóis contendo gases, compostos orgânicos e inorgânicos e nanopartículas metálicas que contribuem para contaminar o ambiente aquático por deposição de partículas  $> 10 \mu\text{m}$  (Silva e Vieira, 2018).

Metais e metaloides estão presentes no meio ambiente devido a processos biogeoquímicos, erosão do solo, alterações geológicas e ressuspensão de sedimentos (Gautam et al., 2016; Masindi e Muedi, 2018); entretanto, com o aumento da população e das atividades industriais, metais estão aumentando no meio ambiente (Fontenele et al., 2009). Da mesma forma, as lagoas costeiras são influenciadas por processos naturais e atividades antrópicas, sendo necessário o biomonitoramento ambiental. O estado do Espírito Santo (Brasil) apresenta um cenário complexo de poluição, principalmente na Região Metropolitana da Grande Vitória, onde existem diferentes fontes de emissão de poluentes, incluindo esgoto doméstico, tráfego de veículos, metalurgia e pelotização e exportação de minério de ferro (Santos et al., 2017; Santos et al., 2022). Duas lagoas, Carapebus e Maemba, nesta região são impactadas por atividades humanas em seu entorno, inclusive por material particulado atmosférico sedimentável (MPASe) devido à sua deposição contínua no solo e na superfície da água (Souza et al., 2018). Este cenário corrobora a hipótese de contaminação de tais lagoas, principalmente por metais e metaloides devido ao complexo industrial metalúrgico próximo, uma vez que os efluentes e o MPASe se dissociam no meio aquático em metais livres e nanopartículas metálicas e podem estar biodisponíveis para a biota (Souza et al., 2021).

Os metais/metaloides possuem propriedades diferentes e, conseqüentemente, efeitos diferentes no organismo; alguns metais são essenciais para o funcionamento do organismo como Fe, Mn, Cu e Zn, mas podem apresentar efeitos tóxicos em altas concentrações; outros são tóxicos mesmo em concentrações muito baixas como Al, Cd, Pb e Hg, perturbando o metabolismo e a fisiologia do organismo (Chen et al., 2021; Garai et al., 2021; Ajala et al., 2022).

Os peixes respondem à contaminação ambiental e são amplamente utilizados como bioindicadores para monitorização de ecossistemas aquáticos, o que permite avaliar o estado de saúde do ambiente (Chovanec et al., 2003; Plessl et al., 2017; Vieira et al. 2022). Biomarcadores hematológicos, imunológicos e fisiológicos apresentam alterações em resposta às mudanças no meio externo e interno e são essenciais para avaliar o estado de saúde e a homeostase dos peixes (Saravanan et al., 2011; Tavares-Dias et al, 2013; Seibel et al., 2021; Witeska et al., 2022; Soares et al., 2022). Os biomarcadores hematológicos permitem avaliar a capacidade de transporte de oxigênio do sangue; os imunológicos refletem a capacidade de defesa do organismo contra patógenos e infecções (Takahashi-Biller et al., 2013; Zanuzzo et al., 2014) e os fisiológicos como o cortisol e a glicose permitem avaliar o nível de estresse para enfrentar os desafios ambientais.

A tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* tem distribuição mundial, é abundante nos reservatórios e lagoas brasileiras. Devido à sua biologia e fisiologia bem estabelecidas (Solis et al., 2007), a espécie tem sido considerada como um modelo para estudos em toxicologia (Abdel-Tawwab e outros, 2012, 2015).

Considerando a proximidade das lagoas Carapebus e Maemba às indústrias metalúrgicas, essas lagoas podem estar contaminadas por metais e metalóides. A presença de contaminantes na água e nos sedimentos pode resultar na bioacumulação em tecidos da tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) que habitam essas lagoas e causar alterações nos parâmetros hematológicos, imunológicos e fisiológicos impactando a saúde dos peixes.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de metais e metalóides na água e sedimento das lagoas Carapebus e Maemba e em Alegre, avaliar se ocorre bioacumulação desses elementos no sangue (eritrócitos e plasma) de *O. niloticus* e os efeitos desses contaminantes utilizando biomarcadores sanguíneos.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Área de estudo

A área de estudo foram duas lagoas costeiras urbanas, localizadas próximas às áreas industriais metalúrgicas: Carapebus e Maemba; a área de referência foi um

centro de aquicultura onde é cultivado *O. niloticus*, localizado no Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), *campus* Alegre, Alegre, ES. Alegre está localizada a aproximadamente 146 km das indústrias metalúrgicas próximas a lagoa Carapebus e 98 km da lagoa Maemba e, aproximadamente 1 km de locais de extração e beneficiamento de granito e mármore.

A Lagoa Carapebus (20°13'41" S e 40°12'46" W) é pequena, possui área de 0,4 km<sup>2</sup> e 1,7 m de profundidade e está localizada na Área de Proteção Ambiental Estadual de Praia Mole. É uma lagoa salobra porque na época das chuvas ou maré alta há contato com a água do mar. O local está contaminado com esgoto doméstico e com MPASe liberado pelas indústrias metalúrgicas e de pelletização e exportação de minério de ferro no Complexo de Tubarão localizado a cerca de 8 km de distância. A lagoa é utilizada também para atividades de pesca e lazer (Silva, 2018).

A Lagoa Maemba está localizada na divisa dos municípios de Guarapari e Anchieta, no litoral sul do estado do Espírito Santo, a 65 km do Complexo de Tubarão. É a maior lagoa do Espírito Santo, com área de 4,9 km<sup>2</sup> e profundidade média de 1,9 m. A lagoa estava ligada ao mar, mas a partir de 1970, foi separada devido à construção de uma estrada. A água dessa lagoa é utilizada como fonte de abastecimento para as comunidades locais, recebe efluentes domésticos e efluentes industriais tratados de uma indústria de pelletização de minério de ferro localizada a 1 km de distância. A atividade industrial parou em 2015, mas voltou a funcionar em dezembro de 2020. A indústria metalúrgica possui um reservatório de resíduos denominado Barragem Norte que recebe as águas residuais de todos os processos internos da indústria, inclusive as águas residuais do mineroduto (transporta minério de ferro de Minas Gerais para o Espírito Santo). Após atingir nível máximo de capacidade da barragem, a água tratada é lançada periodicamente na lagoa.

Água, sedimentos e peixes (*O. niloticus*) foram coletados, em março de 2022, em Carapebus (20°13'41" S 40°12'46" W), em 2 pontos em Maemba (M1 e M2), considerando a descarga de efluentes da barragem Norte: M1 (20°46'07" S 40°34'39" W) a 1,1 km<sup>2</sup> da Barragem Norte e M2 (20°45'26" S 40°34'19" W) a 2 km de distância de M1 e, no centro de aquicultura de Alegre (20°45' 33" S 41°27'13" W).

## 2.2. Matrizes abióticas - Amostragem de água e sedimento

Os parâmetros físico-químicos da água: condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $\text{O}_2$  dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ), pH e salinidade ( $\text{‰}$ ) de cada lagoa e de Alegre foram medidos em campo usando multiparâmetro (Horiba. Kioto, Japão). Água e sedimentos foram amostrados simultaneamente em recipientes limpos; a água foi coletada a 20 cm abaixo da superfície da água e o sedimento foi amostrado manualmente, sem auxílio de draga, pois o nível da água permitia o alcance do sedimento. Toda a amostragem foi feita em triplicata.

### 2.3. Matriz Biótica – Amostragem de peixes e sangue

Tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* ( $n = 12$  em cada local, Massa corporal =  $124 \pm 34,6$  g e comprimento total =  $18 \pm 1,7$  cm) foram coletadas em cada lagoa, Carapebus e Maemba, e em Alegre. A coleta dos peixes foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO nº 77932-5) e foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (CEUA nº 8972160123), pois seguiu os princípios éticos para uso de animal.

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) e o sangue coletado por punção da veia caudal (agulha  $0,80 \times 25$  mm) em seringa heparinizada para análises hematológicas, genotóxicas, mutagênicas e imunológicas e seringa não heparinizada para análise de lisozima. Esfregaços de sangue e todas as análises hematológicas foram feitas imediatamente após a coleta de sangue. Posteriormente, o sangue foi centrifugado e o plasma foi utilizado para medir proteína total, cortisol e glicose, e células sanguíneas, e plasma foram separadas para análises de elementos metálicos. Para análise da lisozima foi utilizado o soro sanguíneo. Soro, plasma e células sanguíneas foram mantidos em  $\text{N}_2$  líquido e depois em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a análise.

O fator de condição relativo ( $K_n$ ) dos peixes coletados foi calculado de acordo com Le Cren (1951) como  $K_n = M_B M_e^{-1}$ , onde  $M_B$  era a massa corporal úmida e  $M_e$  foi a massa corporal úmida esperada com base na relação alométrica entre  $M_B$  e comprimento total ( $L_T$ ) de todos os peixes coletados em todas as lagoas e Alegre expressa como  $M_B = aL_T^b$ .

### 2.4. Identificação e quantificação de metais em matrizes abióticas e bióticas

Para identificação e quantificação de metais e metaloides, a água foi acidificada com HNO<sub>3</sub> 2%, amostras de sedimento, eritrócitos e plasma foram liofilizadas e 0,01 a 0,1 g de cada amostra foram digeridos em 3 mL de HNO<sub>3</sub> destilado, 750 µL de HCl destilado e 250 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas a 100 °C; em seguida, o material digerido foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm. Os brancos foram feitos utilizando apenas os ácidos, sem a amostra biológica, seguindo o mesmo protocolo. Todas as amostras digeridas foram mantidas a 4°C até análise.

Foram analisados vinte e sete elementos metálicos (Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ag, Cd, Sn, Ba, La, Ce, W, Hg, Pb e Bi) na água, no sedimento e no sangue (eritrócitos e plasma), em triplicata, utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Agilent 7500cx, EUA), equipado com amostrador automático ASX-100 (CETAC Technologies, Omaha, NE). A repetibilidade da medição foi de 97%. O controle de qualidade (CQ) e a garantia de qualidade (GQ) foram efetuados usando materiais certificados (CRM) para água (NIST 1640 e 1643) e Spike (certificado de referência Certipur ®) com recuperação de 97,50% ± 8,98%.

## 2.5. Variáveis hematológicas e imunológicas

O hematócrito (Hct) foi medido após centrifugação em microhematócrito (Fanem 211, São Paulo, Brasil) 12.000 rpm por 5 min em tubos de microhematócrito heparinizados. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometemoglobina utilizando kit comercial (Labtest Diagnostica, Belo Horizonte, MG, Brazil) e lida em 540 nm. Para a contagem de hemácias (hemácias), o sangue foi diluído em solução formal de citrato (1:200; v:v; 40% de formol), as contagens foram feitas em duplicata, em câmara de Neubauer. Os índices hematológicos: volume corpuscular médio (VCM), Hb corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Wintrobe (1934). Esfregaços de sangue foram corados com May-Grunwald-Giemsa-Wright segundo Tavares-Dias (2013) e analisados em microscópio de luz (Olympus BX51, Denmark) com objetiva de imersão em óleo (100x) e foi efetuada a estimativa total de leucócitos e trombócitos, percentagens diferenciais de leucócitos e alterações nucleares eritrocitárias (ENAS) e micronúcleos (Shahjahan et al., 2020; Amorim et al., 2023).

A atividade respiratória de leucócitos foi determinada por meio de teste colorimétrico segundo Biller-Takahashi (2013), no qual há redução do corante azul tetrazólio (NBT). A absorvância, à 540 nm, foi medida em leitor de microplacas (SpectraMax<sup>®</sup> M5, Molecular Devices, EUA). A concentração de lisozima foi determinada por ensaio turbidimétrico sérico de acordo com Zanuzzo et al. (2014). A concentração total de proteínas plasmáticas (PTP) foi quantificada usando um refratômetro.

## 2.6. Estresse fisiológico

O cortisol plasmático foi determinado por ensaio imunoenzimático utilizando kit comercial (Cortisol ELISA -EIA– 1887; DRG International, Inc., EUA) e a concentração de glicose foi determinada utilizando kit comercial (Labtest cod 84, São Paulo, Brasil).

## 2.8. Análise estatística

A normalidade e a homogeneidade dos dados foram testadas usando as análises de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. As diferenças entre as lagoas e Alegre foram determinadas aplicando ANOVA one-way ou teste de Kruskal- Wallis seguido do teste post hoc de Tuckey ou Dunn, respectivamente, utilizando o software SigmaPlot (V 12.5). O efeito local (Alegre e lagoas) sobre os biomarcadores foi determinado pela aplicação da Análise de Variância Permutacional (PERMANOVA). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi feita para explorar as relações entre as variáveis. PCA e PERMANOVA foram realizados usando RStudio (V 4.3.1). As correlações de Spearman foram feitas utilizando o software Jamovi (V 2.4.11) para avaliar as correlações entre matrizes (elementos químicos) e biomarcadores e as correlações foram consideradas acima de  $r_s > 0,7$  e  $r_s < -0,7$ . A análise discriminante linear (LDA) foi utilizada para verificar quais variáveis independentes melhor diferenciaram os locais de coleta. A análise de procrustes generalizada (GPA) foi empregada para comparar as variáveis, gerando uma configuração de consenso, que possibilitou avaliar a correspondência entre a concentração de metais e metalóides nas amostras de água, sedimento, eritrócito e plasma e todos os biomarcadores. A LDA e a GPA foram realizadas utilizando o software Statistica 7.1 (StatSoft Inc.). Todas as análises foram realizadas considerando limites de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Variáveis físico-químicas e concentração de metais em água e sedimentos

As variáveis físico-químicas da água são mostradas na Tabela 1. A condutividade, salinidade, pH e O<sub>2</sub> dissolvido foram menores em Alegre. O pH foi mais alto na água em Maemba e, Carapebus apresentou maior salinidade e, conseqüentemente, maior condutividade.

**Tabela 1.** Parâmetros físicos e químicos da água (valores médios, mínimos e máximos) nas lagoas Alegre, Maemba (pontos 1 e 2) e Carapebus. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as lagoas ( $p < 0,05$ ).

Parâmetros	Alegre	Maemba 1	Maemba 2	Carapebus
Condutividade (mS.cm <sup>-1</sup> )	0,122 (0,06 – 0,17) <sup>a</sup>	0,63 (0,63 – 0,64) <sup>ab</sup>	0,631 (0,62 – 0,64) <sup>ab</sup>	4,12 (3,65 – 4,21) <sup>b</sup>
Temperatura (°C)	28,4 (27,86 – 28,94) <sup>a</sup>	29,29 (28,25 – 30,33) <sup>a</sup>	30,79 (30,33 – 31,26) <sup>a</sup>	28,71 (28,09 – 28,95) <sup>a</sup>
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	5,03 (4,91 – 5,20) <sup>a</sup>	8,39 (7,75 – 9,03) <sup>b</sup>	8,67 (8,32 – 9,03) <sup>b</sup>	9,15 (8,73 – 9,73) <sup>b</sup>
pH	6,96 (6,67 – 7,25) <sup>a</sup>	9,14 (8,96 – 9,32) <sup>ab</sup>	9,37 (9,32 – 9,43) <sup>b</sup>	8,36 (8,28 – 8,37) <sup>ab</sup>
Salinidade (%)	0,0 (0,0 – 0,0) <sup>a</sup>	0,03 (0,03 – 0,03) <sup>ab</sup>	0,03 (0,03 – 0,03) <sup>ab</sup>	0,22 (0,19 – 0,22) <sup>b</sup>

Metais e metaloides em águas e sedimentos das lagoas e de Alegre são mostrados nas Tabelas 2 e 3; Fe e Al foram os elementos com maiores concentrações tanto na água quanto no sedimento. Alegre apresentou as maiores concentrações de Fe, Al, Ba, Ti e Ce na água e de Ti, Mn, Ba, Ce, La e Rb no sedimento. A concentração de Rb and Sr nas águas de Carapebus foi maior que nos demais locais; isso foi seguido por concentrações de Fe, Al e Mn; no sedimento, Cr, As and Sr foram mais altas que nas demais locais. Em Maemba M1, as concentrações de Mo, Rb, Cu e As na água foram mais altas e no ponto 2, foram maiores as concentrações de Mo, Rb e As; no sedimento, as concentrações de metais e metaloides foram mais baixas que nos demais pontos, com exceção de Mo que foi mais alta no ponto 2.

**Tabela 2.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) na água ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

	Água				LOD	LOQ
	A	M1	M2	C		
<b>Al</b>	56,7 (37,1-108,1) <sup>a</sup>	57,9 (55,2-63,1) <sup>ab</sup>	41,4 (34,4 - 62,1) <sup>b</sup>	68,1 (66,3 - 72,4) <sup>a</sup>	<b>0,21</b>	<b>0,53</b>
<b>Ti</b>	2,1 ( 2,8 - 8,3) <sup>a</sup>	2,5 (2,1 - 2,5) <sup>b</sup>	<LOQ	2,2 (1,8 - 3,9) <sup>b</sup>	<b>0,06</b>	<b>0,14</b>
<b>V</b>	1,08 (0,9 - 1,2) <sup>a</sup>	2,09 (2,06 - 2,2) <sup>b</sup>	2,3 (1,9 - 2,5) <sup>b</sup>	1,9 (1,4 - 2,3) <sup>b</sup>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>
<b>Cr</b>	1,9 (1,7 - 2,9) <sup>a</sup>	2,1 (1,8 - 2,4) <sup>a</sup>	1,5 (1,4 - 3,4) <sup>a</sup>	2,0 (1,8 - 2,8) <sup>a</sup>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>
<b>Mn</b>	44,8 (5,8 - 68,8) <sup>a</sup>	11,6 (10,7 - 12,5) <sup>a</sup>	2,9 (2,0 - 3,0) <sup>b</sup>	43,5 (17 - 44,8) <sup>a</sup>	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>
<b>Fe<sup>56</sup></b>	51,5 (64,2 - 787) <sup>a</sup>	124 (116 - 131) <sup>a</sup>	58,8 (41,6 - 93,1) <sup>b</sup>	247 (126 - 269) <sup>a</sup>	<b>1,01</b>	<b>2,15</b>
<b>Ni</b>	2,2 (1,0 - 3,1) <sup>a</sup>	0,9 (0,6 - 1,2) <sup>b</sup>	0,9 (0,8 - 1,2) <sup>b</sup>	1,4 (1,4 - 1,9) <sup>a</sup>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>
<b>Cu</b>	3,8 (1,9 - 3,8) <sup>ab</sup>	6,2 (3,5 - 9,0) <sup>b</sup>	3,1 (2,5 - 12,8) <sup>ab</sup>	2,3 (1,9 - 4,2) <sup>a</sup>	<b>0,07</b>	<b>0,17</b>
<b>Zn</b>	1,5 (1,4 - 1,6) <sup>a</sup>	1,6 (1,4 - 1,8) <sup>a</sup>	1,4 (1,2 - 1,5) <sup>a</sup>	1,2 (1,2 - 1,3) <sup>a</sup>	<b>0,79</b>	<b>1,61</b>
<b>As</b>	<LOD	2,2 (2,1 - 2,2) <sup>a</sup>	2,1 (1,9 - 2,2) <sup>b</sup>	<LOQ	<b>0,10</b>	<b>0,22</b>
<b>Se</b>	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<b>0,35</b>	<b>0,82</b>
<b>Rb</b>	3,7 (3,5 - 3,8) <sup>a</sup>	13,6 (13,3 - 13,9) <sup>c</sup>	11,2 (9,7 - 11,6) <sup>b</sup>	11,8 (9,7 - 12,4) <sup>b</sup>	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>
<b>Sr</b>	38,2 (38,1 - 40,6) <sup>a</sup>	58,7 (57,7 - 56,6) <sup>b</sup>	52,8 (46,8 - 56,6) <sup>b</sup>	523 (492 - 538) <sup>c</sup>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>
<b>Y</b>	0,2 (0,1 - 0,2) <sup>a</sup>	<LOQ	<LOQ	0,1 (0,1 - 0,1) <sup>a</sup>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>
<b>Zr</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<b>0,03</b>	<b>0,06</b>
<b>Nb</b>	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>
<b>Mo</b>	<LOD	19,3 (19,2 - 19,3) <sup>a</sup>	17,7 (15,5 - 18,8) <sup>b</sup>	<LOQ	<b>0,06</b>	<b>0,13</b>
<b>Ag</b>	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<b>0,03</b>	<b>0,08</b>
<b>Cd</b>	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>
<b>Sn</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>
<b>Ba</b>	51,3 (46,3 - 55,6) <sup>a</sup>	17,9 (16,8 - 18,8) <sup>c</sup>	13,9 (12,7 - 18,7) <sup>b</sup>	9,6 (9,4 - 14,1) <sup>c</sup>	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>
<b>La</b>	1,4 (0,8 - 1,6) <sup>a</sup>	0,4 (0,3 - 0,6) <sup>b</sup>	0,8 (0,4 - 1,4) <sup>a</sup>	1,1 (0,7 - 1,2) <sup>a</sup>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>
<b>Ce</b>	4,4 (3,0 - 6,5) <sup>a</sup>	0,4 (0,2 - 0,7) <sup>b</sup>	1,2 (0,3 - 3,9) <sup>c</sup>	2,5 (1,2 - 3,1) <sup>ac</sup>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>
<b>W</b>	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>
<b>Hg</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<b>0,05</b>	<b>0,09</b>
<b>Pb</b>	<LOQ	2,1 (1,6 - 2,6) <sup>a</sup>	<LOQ	1,9 (1,7 - 2,1) <sup>a</sup>	<b>0,07</b>	<b>0,14</b>
<b>Bi</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<b>0,08</b>	<b>0,21</b>

**Tabela 3.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) no sedimento ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

	Sedimento				LOD	LOQ
	A	M1	M2	C		
<b>Al</b>	7348 (6070 - 12415) <sup>a</sup>	265 (176 - 467) <sup>b</sup>	742 (423 - 1058) <sup>c</sup>	9439 (3300 - 10576) <sup>a</sup>	0,61	1,70
<b>Ti</b>	26,0 (23,6 - 33,1) <sup>a</sup>	11,2 (7,4 - 14,9) <sup>b</sup>	11,4 (8,0 - 62,2) <sup>bc</sup>	61,9 (53,2 - 138) <sup>c</sup>	0,83	2,34
<b>V</b>	33,9 (33,3 - 44,1) <sup>a</sup>	1,0 (0,9 - 1,6) <sup>b</sup>	2,6 (1,9 - 2,7) <sup>b</sup>	47,9 (25,3 - 58,8) <sup>a</sup>	0,01	0,02
<b>Cr</b>	9,3 (8,1 - 15,0) <sup>a</sup>	<LOQ	<LOQ	23,2 (10,6 - 24,7) <sup>b</sup>	0,01	0,03
<b>Mn</b>	186 (174 - 213) <sup>a</sup>	<LOQ	3,1 (3,0 - 6,1) <sup>c</sup>	29,3 (19,4 - 127,2) <sup>b</sup>	0,01	0,02
<b>Fe<sup>56</sup></b>	1285,1 (859,9 - 1422,1) <sup>a</sup>	2930 (1482 - 3247) <sup>b</sup>	2965 (1645 - 3687) <sup>b</sup>	11371 (10088 - 13899) <sup>a</sup>	1,37	3,12
<b>Ni</b>	1,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	<LOQ	<LOQ	1,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,02	0,05
<b>Cu</b>	3,5 (0,7 - 27,2) <sup>a</sup>	<LOQ	<LOQ	8,6 (3,2 - 10,9) <sup>a</sup>	0,08	0,23
<b>Zn</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,14	0,38
<b>As</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,1 (3,6 - 17,1)	0,19	0,33
<b>Se</b>	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	0,49	1,17
<b>Rb</b>	3,2 (3,1 - 3,3) <sup>a</sup>	<LOQ	<LOQ	2,1 (1,0 - 2,3) <sup>b</sup>	0,03	0,07
<b>Sr</b>	6,6 (6,4 - 9,5) <sup>a</sup>	<LOQ	0,9 (0,8 - 2,6) <sup>c</sup>	113 (42,5 - 609) <sup>b</sup>	0,05	0,08
<b>Y</b>	4,5 (4,1 - 11,1) <sup>a</sup>	<LOD	<LOD	7,3 (6,6 - 7,8) <sup>b</sup>	0,47	1,35
<b>Zr</b>	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	0,05	0,13
<b>Nb</b>	0,3 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	<LOD	<LOQ	0,3 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,02	0,04
<b>Mo</b>	<LOD	<LOQ	1,5 (1,4 - 1,5)	<LOQ	0,14	0,34
<b>Ag</b>	6,1 (0,2 - 9,7) <sup>a</sup>	4,3 (3,8 - 12,2) <sup>a</sup>	1,5 (0,4 - 2,4) <sup>b</sup>	3,1 (2,3 - 5,7) <sup>ab</sup>	0,04	0,07
<b>Cd</b>	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	0,03	0,04
<b>Sn</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,15	0,41
<b>Ba</b>	91,1 (85,1 - 102) <sup>a</sup>	1,3 (1,1 - 1,6) <sup>b</sup>	0,5 (0,4 - 1,9) <sup>b</sup>	9,2 (2,9 - 13,0) <sup>a</sup>	0,07	0,15
<b>La</b>	26,9 (25,8 - 39,2) <sup>a</sup>	2,0 (1,3 - 2,7) <sup>b</sup>	4,8 (1,7 - 6,8) <sup>b</sup>	12,9 (10,2 - 17,6) <sup>c</sup>	0,09	0,21
<b>Ce</b>	89,0 (80,3 - 121) <sup>a</sup>	4,4 (2,8 - 6,0) <sup>b</sup>	9,5 (3,3 - 14,0) <sup>b</sup>	34,1 (28,5 - 48,3) <sup>a</sup>	0,24	0,63
<b>W</b>	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,01	0,04
<b>Hg</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,02	0,05
<b>Pb</b>	9,3 (8,7 - 12,0) <sup>a</sup>	3,0 (2,9 - 3,6) <sup>b</sup>	0,2 (0,1 - 0,4) <sup>b</sup>	7,0 (5,2 - 15,2) <sup>a</sup>	0,02	0,05
<b>Bi</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,15	0,37

### 3.2. Fator de condição dos peixes ( $K_n$ ) e metais e metalóides no sangue

A relação entre massa corporal e comprimento total de *O. niloticus* de todos os locais foi descrita como  $M_B = 0,23 L_T^{2,1758}$ ,  $r^2 = 0,757$  (Fig. 1A). A Figura 1B mostra os valores individuais de  $K_n$  de cada lagoa e Alegre. As médias de  $K_n$  foram Alegre:  $K_n = 1,053$  (0,913 – 1,190), Maemba -M1:  $K_n = 0,907$  (0,795 – 0,936), M2:  $K_n = 0,985$  (0,907 – 1,084) e Carapebus:  $K_n = 1,050$  (0,908 – 1,125). O  $K_n$  dos peixes de Alegre foi significativamente maior que os de Maemba-M1 e não diferiu dos de Carapebus.

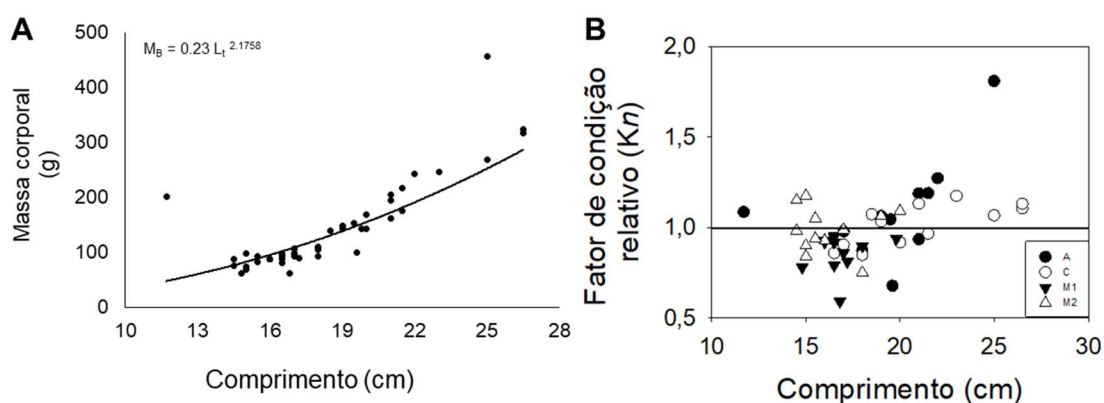


Figura 1. Relação entre o comprimento total e a massa corpórea de *O. niloticus* (A) e o fator de condição relativo ( $K_n$ ) em relação ao comprimento total (B) de *O. niloticus* ( $n=12$  cada local) coletados em diferentes lagos: Alegre (A), Carapebus (C), Maemba ponto 1 (M1) e Maemba ponto 2 (M2).

Embora a concentração de metais/metalóides na água e no sedimento tenha sido maior em Alegre (Tabelas 2 e 3), a concentração deles nos eritrócitos e no plasma foi menor que nos peixes de Maemba e Carapebus (Tabelas 4 e 5). As concentrações de Ti, Cu, Zn, As, Rb, Y, La, Ce não diferiram nos eritrócitos dos peixes das lagoas e Alegre. Nos eritrócitos dos peixes coletados em Maemba-M1 e -M2, V, Se e Sn foram maiores que nos de Carapebus e Alegre; Mn, Ni, Zr, Ag e Ba foram maiores nos peixes do Maemba M2 do que nos peixes do M1 (Tabela 4). As concentrações de Fe e Sr nos eritrócitos dos peixes de Carapebus foram maiores que nos peixes de Maemba e Alegre.

Os metais/metalóides no plasma variaram entre os peixes de cada local; as maiores concentrações plasmáticas foram Fe e Zn; dos metais/metalóides analisados as maiores concentrações foram encontradas nos peixes de Maemba M1 e M2 e as menores foram nos peixes de Carapebus (Tabela 5).

Tabela 4. Concentração de metais e metaloides (mediana e valores de 1º e 3º quartil) nos eritrócitos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) do sangue de *O. niloticus* coletado em Alegre (A) e nas lagoas do ponto Maemba1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ ).

	Eritrócito				LOD	LOQ
	A	M1	M2	C		
<b>Al</b>	17,0 (16,8 - 33,3) <sup>a</sup>	7,5 (5,6 - 14,1) <sup>b</sup>	23,4 (6,9 - 52,7) <sup>a</sup>	27,7 (26,8 - 229) <sup>a</sup>	0,214	0,528
<b>Ti</b>	0,4 (0,2 - 0,5) <sup>a</sup>	0,2 (0,1 - 0,4) <sup>a</sup>	<LOQ	0,3 (0,16 - 3,4) <sup>a</sup>	0,025	0,025
<b>V</b>	0,1 (0,05 - 0,1) <sup>a</sup>	0,4 (0,3 - 1,6) <sup>bc</sup>	0,6 (0,5 - 0,8) <sup>b</sup>	0,1 (0,1 - 0,8) <sup>ac</sup>	0,009	0,021
<b>Cr</b>	8,6 (0,6 - 47,8) <sup>a</sup>	<LOQ	1,1 (0,1 - 3,3) <sup>a</sup>	1,5 (0,5 - 22,1) <sup>a</sup>	0,014	0,029
<b>Mn</b>	1,3 (0,8 - 1,7) <sup>a</sup>	0,3 (0,1 - 0,4) <sup>b</sup>	0,8 (0,5 - 1,1) <sup>a</sup>	0,9 (0,5 - 4,5) <sup>a</sup>	0,035	0,069
<b>Fe<sup>56</sup></b>	2142 (1964 - 2149) <sup>a</sup>	2004 (1974 - 2449) <sup>ab</sup>	2379 (1874 - 3055) <sup>ab</sup>	2323 (2251 - 9194) <sup>b</sup>	0,861	1,856
<b>Ni</b>	0,1 (0,04 - 0,6) <sup>ab</sup>	0,06 (0,032 - 0,1) <sup>a</sup>	0,5 (0,1 - 1,5) <sup>b</sup>	0,1 (0,1 - 0,5) <sup>ab</sup>	0,013	0,031
<b>Cu</b>	2,5 (1,5 - 2,5) <sup>a</sup>	2,2 (1,1 - 3,3) <sup>a</sup>	2,5 (0,9 - 3,3) <sup>a</sup>	2,5 (2,1 - 6,0) <sup>a</sup>	0,073	0,166
<b>Zn</b>	25,8 (18,1 - 40,6) <sup>a</sup>	50,9 (9,9 - 58,5) <sup>a</sup>	40,2 (24,5 - 42,4) <sup>a</sup>	32,2 (31,1 - 147) <sup>a</sup>	0,795	1,613
<b>As</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,102	0,218
<b>Se</b>	1,6 (1,3 - 1,8) <sup>a</sup>	55,5 (45,2 - 56,5) <sup>b</sup>	62,4 (39,6 - 86,6) <sup>b</sup>	2,9 (2,9 - 9,2) <sup>a</sup>	0,303	0,663
<b>Rb</b>	4,8 (4,4 - 4,9) <sup>a</sup>	4,5 (3,9 - 4,8) <sup>a</sup>	5,7 (3,0 - 6,5) <sup>a</sup>	5,1 (3,7 - 14,0) <sup>a</sup>	0,027	0,062
<b>Sr</b>	0,8 (0,6 - 1,3) <sup>a</sup>	1,7 (0,3 - 2,4) <sup>a</sup>	0,8 (0,1 - 1,6) <sup>a</sup>	3,3 (2,0 - 12,2) <sup>b</sup>	0,012	0,027
<b>Y</b>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,002	0,004
<b>Zr</b>	0,8 (0,03 - 0,1) <sup>ac</sup>	<LOQ	0,4 (0,0 - 1,3) <sup>bc</sup>	0,2 (0,1 - 0,4) <sup>b</sup>	0,033	0,079
<b>Nb</b>	0,007 (0,004 - 0,008) <sup>a</sup>	<LOQ	0,05 (0,01 - 0,1) <sup>b</sup>	0,03 (0,008 - 0,05) <sup>b</sup>	0,012	0,031
<b>Mo</b>	0,1 (0,05 - 0,1) <sup>a</sup>	0,2 ± (0,2 - 0,2) <sup>b</sup>	<LOQ	<LOQ	0,061	0,133
<b>Ag</b>	0,04 (0,04 - 0,3) <sup>a</sup>	0,9 (0,8 - 3,9) <sup>b</sup>	4,5 (4,0 - 43,0) <sup>c</sup>	3,3 (1,4 - 13,4) <sup>bc</sup>	0,028	0,066
<b>Cd</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,013	0,030
<b>Sn</b>	17,7 (17,5 - 18,8) <sup>a</sup>	31,4 (30,7 - 58,2) <sup>ab</sup>	37,8 (33,1 - 117,5) <sup>b</sup>	17,1 (15,2 - 119,3) <sup>a</sup>	0,011	0,025
<b>Ba</b>	0,3 (0,2 - 0,8) <sup>ab</sup>	0,1 (0,1 - 0,1) <sup>c</sup>	0,8 (0,2 - 6,8) <sup>a</sup>	0,3 (0,006 - 0,5) <sup>bc</sup>	0,078	0,192
<b>La</b>	0,02 (0,01 - 0,03) <sup>a</sup>	0,01 (0,01 - 0,03) <sup>a</sup>	0,01 (0,01 - 0,2) <sup>a</sup>	0,01 (0,01 - 0,14) <sup>a</sup>	0,005	0,012
<b>Ce</b>	0,05 (0,03 - 0,1) <sup>a</sup>	<LOQ	0,2 (0,02 - 0,3) <sup>a</sup>	0,1 (0,02 - 0,3) <sup>a</sup>	0,004	0,009
<b>W</b>	0,1 (0,1 - 0,1) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 - 0,2) <sup>b</sup>	<LOQ	<LOQ	0,011	0,027
<b>Hg</b>	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	0,010	0,021
<b>Pb</b>	0,12 (0,11 - 0,13) <sup>a</sup>	<LOQ	<LOQ	0,09 (0,05 - 0,22) <sup>a</sup>	0,038	0,082
<b>Bi</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,077	0,186

Tabela 5. Concentração de metais e metaloides (mediana e valores de 1º e 3º quartil) no plasma ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) do sangue de *O. niloticus* coletado em Alegre (A) e nas lagoas do ponto Maemba1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ ).

	Plasma				LOD	LOQ
	A	M1	M2	C		
Al	106 (49,3 - 112) <sup>a</sup>	93,5 (47,0 - 288) <sup>a</sup>	38,5 (25,8 - 51,5) <sup>b</sup>	110 (33,9 - 229) <sup>a</sup>	0,214	0,528
Ti	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,2 (0,06 - 0,4)	0,025	0,025
V	0,1 (0,1 - 0,2) <sup>a</sup>	1,8 (1,1 - 6,4) <sup>c</sup>	1,0 (0,3 - 3,1) <sup>bc</sup>	0,5 (0,5 - 0,6) <sup>b</sup>	0,009	0,021
Cr	9,9 (6,1 - 12,5) <sup>a</sup>	3,3 (2,3 - 38,5) <sup>ab</sup>	8,9 (0,6 - 11,7) <sup>ab</sup>	1,7 (1,3 - 6,5) <sup>b</sup>	0,014	0,029
Mn	0,4 (0,1 - 0,5) <sup>a</sup>	1,7 (0,5 - 2,9) <sup>bc</sup>	2,0 (1,7 - 2,5) <sup>c</sup>	0,6 (0,4 - 1,1) <sup>ab</sup>	0,035	0,069
Fe <sup>56</sup>	98,4 (63,4 - 125) <sup>a</sup>	627 (217 - 659) <sup>b</sup>	1389 (173 - 2411) <sup>b</sup>	202 (185 - 637) <sup>b</sup>	0,861	1,856
Ni	0,2 (0,1 - 0,2) <sup>a</sup>	0,5 (0,1 - 3,1) <sup>a</sup>	3,4 (1,4 - 5,3) <sup>b</sup>	0,5 (0,4 - 0,8) <sup>a</sup>	0,013	0,031
Cu	13,1 (10,3 - 13,9) <sup>a</sup>	11,2 (11,0 - 21,5) <sup>a</sup>	22,3 (20,2 - 24,4) <sup>b</sup>	11,3 (10,1 - 18,0) <sup>a</sup>	0,073	0,166
Zn	164 (133 - 185) <sup>a</sup>	196 (177 - 472) <sup>b</sup>	256 (84,3 - 282) <sup>ab</sup>	195 (166 - 215) <sup>ab</sup>	0,795	1,613
As	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,5 (0,4 - 0,7)	0,102	0,218
Se	<LOQ	29,0 (25,2 - 45,4) <sup>a</sup>	33,0 (32,1 - 35,9) <sup>a</sup>	2,1 (2,0 - 2,3) <sup>b</sup>	0,303	0,663
Rb	29,0 (28,6 - 32,9) <sup>a</sup>	1,5 (0,3 - 1,9) <sup>b</sup>	3,6 (1,4 - 5,2) <sup>b</sup>	1,6 (0,8 - 2,0) <sup>b</sup>	0,027	0,062
Sr	14,6 (12,5 - 15,1) <sup>a</sup>	12,9 (10,9 - 36,4) <sup>a</sup>	9,8 (3,1 - 11,6) <sup>b</sup>	24,1 (22,0 - 29,4) <sup>a</sup>	0,012	0,027
Y	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,002	0,004
Zr	3,0 (0,1 - 6,0) <sup>a</sup>	0,7 (0,2 - 1,2) <sup>ab</sup>	2,3 (1,4 - 2,7) <sup>a</sup>	0,1 (0,01 - 0,2) <sup>b</sup>	0,033	0,079
Nb	0,02 (0,02 - 0,03) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 - 0,2) <sup>b</sup>	<LOD	<LOQ	0,012	0,031
Mo	0,5 (0,4 - 0,6) <sup>a</sup>	0,6 (0,6 - 0,7) <sup>c</sup>	<LOQ	0,3 (0,2 - 0,3)	0,061	0,133
Ag	0,7 (0,6 - 1,6) <sup>a</sup>	32,8 (17,9 - 204) <sup>b</sup>	13,2 (12,1 - 34,7) <sup>bc</sup>	10,8 (7,3 - 17,1) <sup>ac</sup>	0,028	0,066
Cd	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	0,013	0,030
Sn	62,9 (58,5 - 79,8) <sup>a</sup>	145 (124 - 525) <sup>b</sup>	89,7 (48,2 - 124) <sup>a</sup>	49,1 (29,5 - 62,1) <sup>a</sup>	0,011	0,025
Ba	1,5 (1,2 - 14,5) <sup>a</sup>	1,6 (0,2 - 3,0) <sup>a</sup>	0,9 (0,4 - 1,4) <sup>a</sup>	1,2 (0,2 - 3,3) <sup>a</sup>	0,078	0,192
La	<LOQ	0,1 (0,06 - 0,1) <sup>a</sup>	<LOQ	0,1 (0,03 - 0,1) <sup>a</sup>	0,005	0,012
Ce	<LOQ	0,1 (0,1 - 0,1) <sup>a</sup>	<LOQ	0,1 (0,1 - 0,3) <sup>a</sup>	0,004	0,009
W	0,05 (0,05 - 0,06) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 - 0,13) <sup>b</sup>	<LOQ	0,04 (0,03 - 0,05) <sup>a</sup>	0,011	0,027
Hg	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,010	0,021
Pb	<LOQ	<LOQ	3,6 (2,6 - 4,5)	<LOQ	0,038	0,082
Bi	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,077	0,186

### 3.3. Biomarcadores de estresse hematológicos, imunológicos, genotóxicos, mutagênicos e fisiológicos

**Tabela 6.** Variáveis hematológicas e imunológicas (média  $\pm$  SEM) do sangue de tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, coletadas nas lagoas Alegre, Maemba (pontos 1 e 2) e Carapebus. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e lagoas ( $p < 0,05$ ).

Parâmetros	Lagoas			
	Alegre	Maemba 1	Maemba 2	Carapebus
<b>Células vermelhas</b>				
Hematócrito (%)	26,4 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>	29,7 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	27,2 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	7,5 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>
Eritrócito (x 10 <sup>6</sup> $\mu$ L <sup>-1</sup> )	3,8 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	2,6 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
VCM (fL)	67,5 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>	121,6 $\pm$ 21,2 <sup>b</sup>	103,4 $\pm$ 22,3 <sup>b</sup>	102,4 $\pm$ 25,0 <sup>b</sup>
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	33,1 $\pm$ 4,8 <sup>ac</sup>	7,0 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	34,1 $\pm$ 3,9 <sup>c</sup>	29,0 $\pm$ 4,1 <sup>a</sup>
HCM (pg cel <sup>-1</sup> )	23,4 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	9,2 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	34,3 $\pm$ 4,7 <sup>c</sup>	26,8 $\pm$ 7,3 <sup>a</sup>
<b>Leucograma</b>				
Leucócitos (x 10 <sup>4</sup> $\mu$ L)	4,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	5,8 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>
Trombócitos (x 10 <sup>3</sup> $\mu$ L)	28,2 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	25,1 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	12,7 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	14,1 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>
Monócitos (% <sup>o</sup> )	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	2,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Linfócitos (% <sup>o</sup> )	55,2 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	74,0 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	82,9 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>	79,8 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
Neutrófilos (% <sup>o</sup> )	31,2 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	18,9 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	5,8 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	4,8 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>
Basófilos (% <sup>o</sup> )	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Eosinófilos (% <sup>o</sup> )	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	4,0 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	9,8 $\pm$ 1,2 <sup>c</sup>
Célula granulocítica especial (% <sup>o</sup> )	8,7 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 1,0 <sup>ab</sup>	1,1 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	4,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
<b>Anomalias</b>				
Núcleo normal (% <sup>o</sup> )	96,3 $\pm$ 2,4	98,5 $\pm$ 1,2	98,5 $\pm$ 1,1	98,6 $\pm$ 1,3
Núcleo com broto (% <sup>o</sup> )	2,0 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,8 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
Núcleo lobado (% <sup>o</sup> )	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
Núcleo entalhado (% <sup>o</sup> )	2,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
Núcleo com vacúolo (% <sup>o</sup> )	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Dano mutagênico</b>				
Micronúcleo (% <sup>o</sup> )	0,1 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	0,6 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>

Em todos os locais não houve diferenças significativas no Hct de tilápia-do-nylo; entretanto, em Alegre, o maior RBC resultou em menor VCM (Tabela 6). As concentrações de Hb foram maiores nos peixes de Alegre e Maemba-M2 e as concentrações de Hb, HCM e CHCM foram menores nos peixes de Maemba -M1 do que nos peixes de outros locais (Tabela 6).

O volume de leucócitos totais foi maior nos peixes de Maemba -M1 do que em M2, Carapebus e Alegre (Tabela 6). Considerando os tipos de leucócitos, em Alegre o percentual de linfócitos foi menor e de neutrófilos e células granulocíticas especiais foi maior que nos demais locais. Os eosinófilos foram maiores nos peixes coletados em Carapebus, os monócitos não diferiram entre os locais e os basófilos foram raramente encontrados (Tabela 6). Os trombócitos totais foram maiores nos peixes de Alegre e Maemba-M1.

A maioria dos eritrócitos apresentou núcleo normal (98%). Os ENAs foram maiores nos peixes de Alegre seguido de Maemba-M1 e M2; a bolha foi maior nos peixes de Alegre e a entalhada e lobada foi maior nos peixes de Alegre e Maemba. Os peixes de Carapebus apresentaram menores ENAs, mas maiores micronúcleos evidenciando algum grau de indução de mutagenicidade (Tabela 6).

A atividade respiratória de leucócitos foi menor nos peixes de Alegre (Figura 2A), a lisozima sérica e a concentração plasmática total foram menores nos peixes de Alegre e Carapebus (Figura 2B e 2C).

O cortisol plasmático foi maior nos peixes de Carapebus, mas não diferiu dos peixes de Maemba M1 e M2 (Fig. 3A) e a glicose foi maior nos peixes de Maemba-M1 (Fig. 3B).

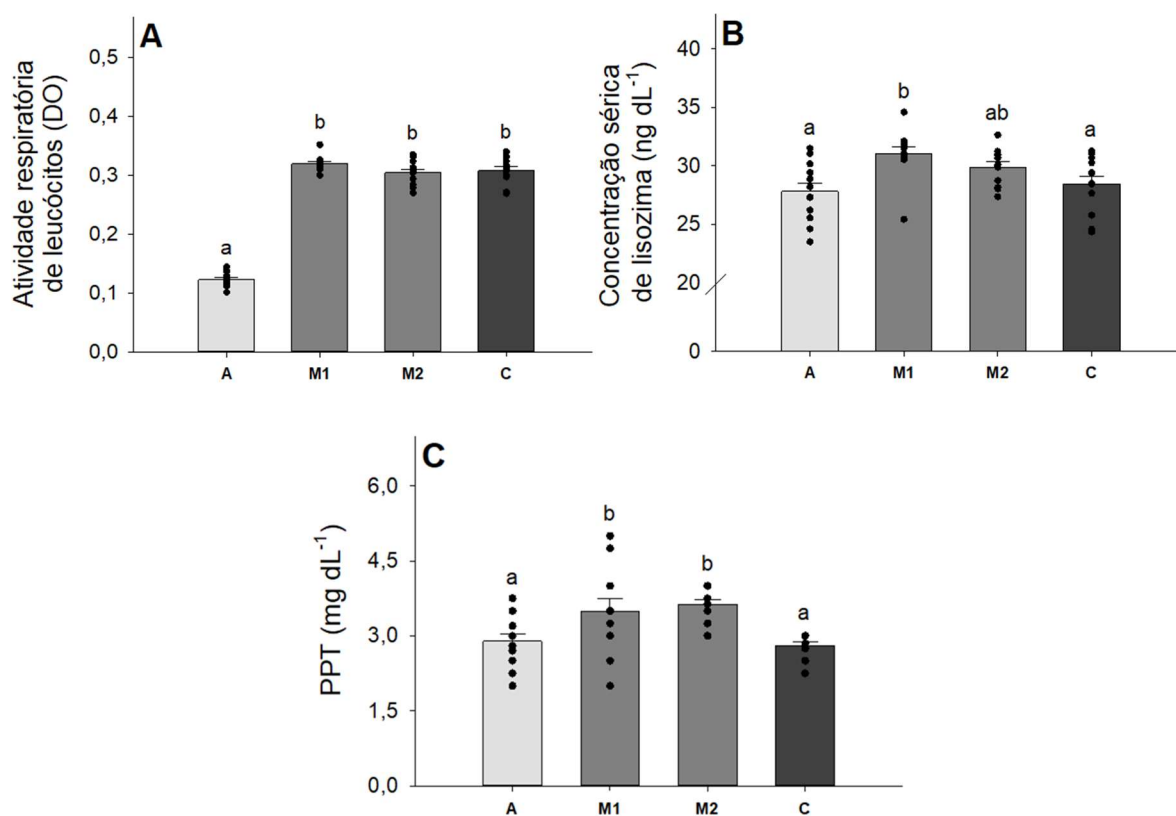


Figura 2. Biomarcadores imunológicos em tilápia-do-nylo, *O. niloticus* (n=12), coletados nas lagoas Alegre (A), Maemba Ponto1 (M1), Maemba Ponto 2 (M2) e Carapebus (C). A: Atividade respiratória leucocitária, B: Concentração sérica de lisozima e C: Proteína plasmática total (TPP). Valores representados por média  $\pm$  SEM (n=12). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

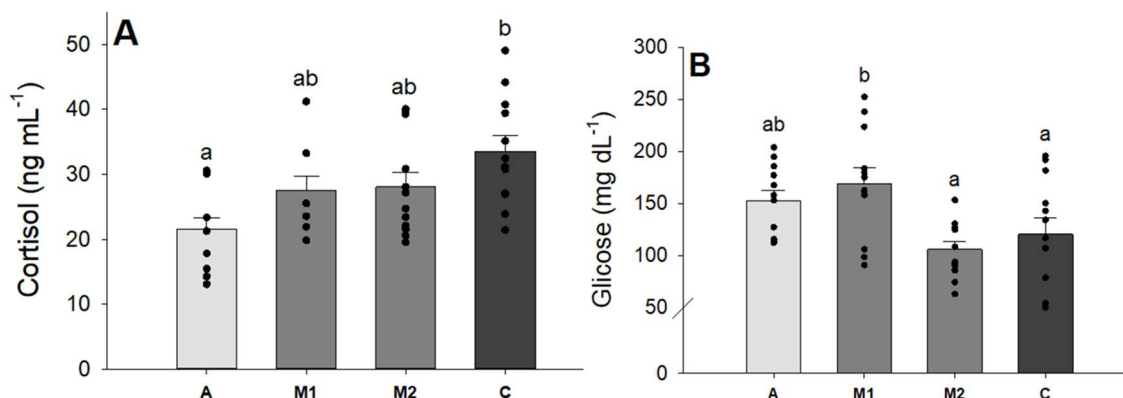


Figura 3. Biomarcadores de estresse fisiológico em tilápia-do-nylo, *O. niloticus* (n=12), coletados nas lagoas Alegre (A), Maemba Ponto1 (M1), Maemba Ponto 2 (M2) e Carapebus (C). A: Cortisol, B: Glicose. Valores representados por média  $\pm$  SEM (n=12). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

### 3.4. Análise de Componentes Principais (PCA)

A integração dos biomarcadores pela análise de PCA explica 49,4% da variabilidade total dos dois componentes principais (PC 1: 31,7% e PC 2: 17,7%) (Figura 4A). As lagoas Maemba e Carapebus foram separadas de Alegre pelo PC 1. Além disso, o PC 1 indicou a associação de hemácias, ENAs (entalhados, com brotos e lobados) e leucócitos (neutrófilos e monócitos) a Alegre. PC 2 agrupou Carapebus e Maemba-M2 associados ao cortisol, atividade respiratória de leucócitos, linfócitos, eosinófilos e micronúcleos. Maemba-M1 foi associado com leucócitos totais e concentração de lisozima, e inversamente associado a hemoglobina, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média.

A integração PCA de metais em eritrócitos e biomarcadores (Figura 4B) explica 53,9% da variabilidade total dos dados (PC 1: 33,1% e PC 2: 20,8%). O micronúcleo foi associado aos metais Ag, Nb, Sn e Sr nas lagoas Maemba (M2) e Carapebus, e os biomarcadores em Alegre não foram associados a nenhum metal nos eritrócitos. A PCA integrando biomarcadores e metais no plasma explicou 44,3% da variabilidade total dos dados (PC 1: 24,5% e PC 2: 19,8%) (Figura 4C). Os leucócitos foram associados aos metais Sn, La, Ag, Sr, Al, V e Zn no plasma em Maemba (M1), o cortisol e o eosinófilo foram associados aos metais Mn, Fe, Ti e Pb no plasma em Maemba (M2) e Carapebus, além de estarem associados ao linfócito e aos metais Cu e Ni no plasma em Carapebus.

### 3.5. Correlação de Serman

A análise de correlação de Serman correlacionou a concentração de metais nos eritrócitos com Mn em água ( $r_s = 0,91$ ) e Al, Ti, V, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ag, Sn, Ba, La, Ce, W e Pb ( $r_s = 1$ ) no sedimento.

Considerando os metais nos eritrócitos, o As com núcleo entalhado ( $r_s = 0,75$ ). Enquanto que no plasma, o W foi negativamente correlacionado com Hb e HCM ( $r_s = -0,80$ ), As e Nb com neutrófilos ( $r_s = 0,81$  e  $r_s = 0,71$ , respectivamente) e eosinófilos ( $r_s = 0,90$  e  $r_s = -0,81$ , respectivamente), Mo com eosinófilos ( $r_s = -0,70$ ).

Leucócitos totais e trombócitos não foram correlacionados com nenhum metal/metaloide.

A atividade respiratória de leucócitos foi correlacionada com Rb ( $r_s = 0,74$ ) e Mo na água ( $r_s = 0,69$ ) e sedimento ( $r_s = 0,74$ ). A lisozima sérica e a concentração plasmática total não apresentaram correlação com metais/metaloídes na água e no sedimento. Os níveis de cortisol e glicose não apresentaram correlação com metais.

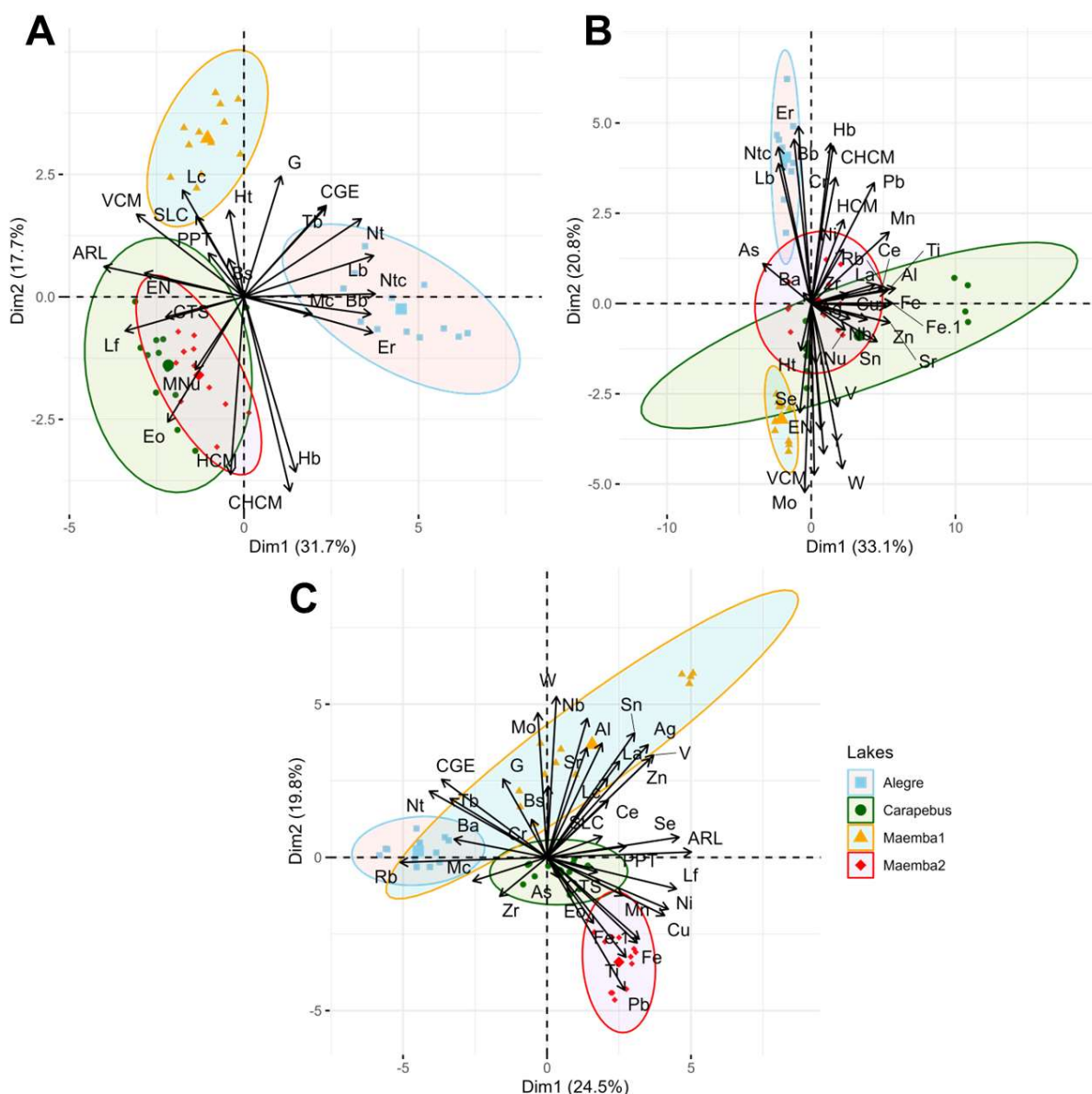


Figura 4. Biplots de PCA representando respostas de biomarcadores sanguíneos de *O. niloticus* (A), biomarcadores sanguíneos e metais em eritrócitos de *O. niloticus* (B) e biomarcadores sanguíneos e metais em plasma de *O. niloticus* (C). Os agrupamentos estão relacionados a diferentes lagoas (Alegre, Maemba ponto 1 e 2 e Carapebus). Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; PPT: proteína plasmática total; CTS: cortisol; SLC: lisozima; G: glicose; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular; HCM: hemoglobina corpuscular média; Er: eritrócitos totais; ARL: atividade respiratória de leucócitos; Lc: leucócitos totais; Tb: trombócitos totais; Mc: monócito; Lf: linfócito; Nt: neutrófilo; Eo: eosinófilo; CGE: célula granulocítica especial; LI: leucócitos imaturos; EN: eritrócito normal; Bb: núcleo com broto; Lb: núcleo lobado; Ntc: núcleo entalhado; MNU: micronúcleo.

### 3.6. Análise discriminante linear (LDA)

A LDA foi aplicada para identificar quais biomarcadores explicaram melhor as diferenças espaciais. Dos 24 biomarcadores, 15 foram utilizados para diferenciar os pontos de coleta (atividade respiratória de leucócitos, CHCM, micronúcleo, célula granulocítica especial, neutrófilo, núcleo lobado, núcleo entalhado, trombócito, número total de eritrócitos, eritrócito normal, basófilo, glicose, núcleo com broto, leucócitos, hematócrito), sendo que 12 desses biomarcadores foram suficientes para uma classificação 100% correta.

### 3.7. Análise de procrustes generalizada (GPA)

A GPA foi aplicada para avaliar a correspondência entre as concentrações de metal na água, no sedimento, nos eritrócitos e no plasma dos peixes coletados nas lagoas e em Alegre, e os biomarcadores que utilizavam eritrócito e os que utilizavam o plasma. A soma dos eixos da GPA explicaram 75,2% da variância total (primeiro eixo (CP1)= 42,4%; e segundo eixo (CP2)= 32,8%) (Figura 5). A CP1 gerou uma configuração de consenso que separou a Alegre das lagoas e a CP2 separou Maemba de Carapebus. As concentrações de metais no sedimento com a concentração de metais nos eritrócitos se sobreporam em todos os locais de coleta, sugerindo forte correspondência, incluindo também a concentração de metais no plasma quando se observa o ponto 2 da Maemba. A GPA sugere que tanto os biomarcadores no eritrócito quanto no plasma não tinham correspondência forte com os metais no eritrócito e no plasma, respectivamente.

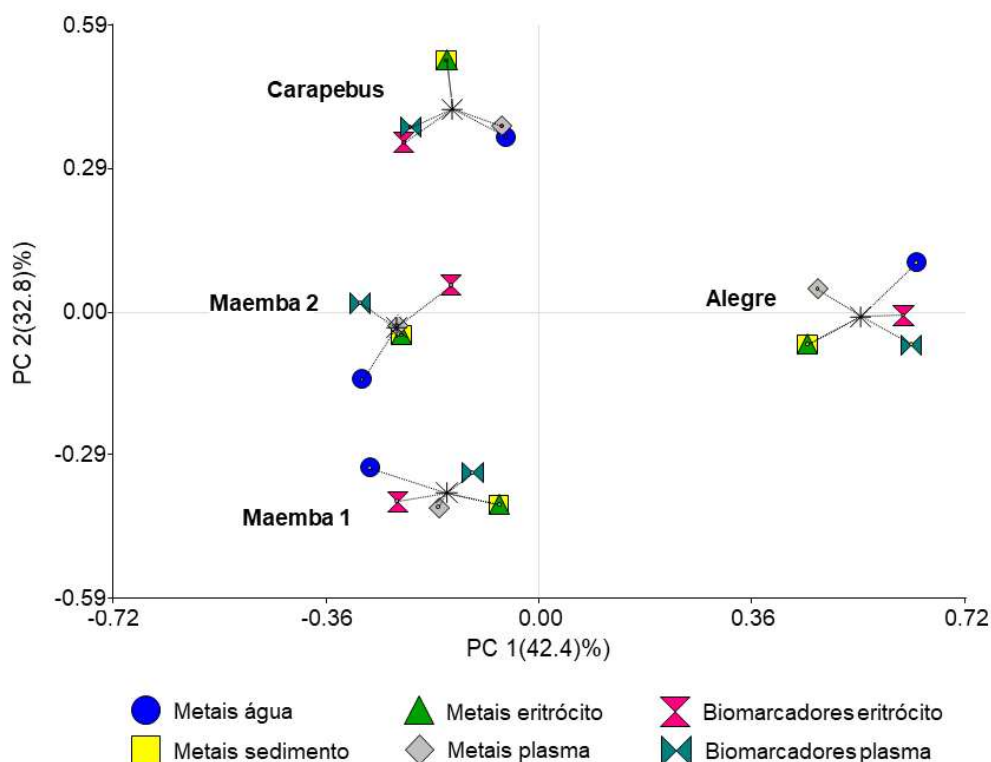


Figura 5. Biplot de GPA considerando as concentrações de metais na água e no sedimento, nos eritrócitos e no plasma e os biomarcadores medidos no eritrócito e plasma de *O. niloticus*, coletados em Alegre, Maemba ponto 1 e 2, e Carapebus.

#### 4. Discussão

A água e o sedimento de todos os locais apresentaram diferenças e semelhanças associadas à localização e às ações antrópicas do entorno. As diferenças nas características físico-químicas como condutividade e salinidade que diferenciaram Carapebus dos demais locais evidenciam a influência da comunicação periódica com o mar durante o período chuvoso ou associada às variações de maré tornando essas águas salobras de acordo com a resolução CONAMA 357, 2005 (CONAMA, 2005) que define os limites de salinidade em água doce, salobra e marinha. Da mesma forma, o nível de  $O_2$  dissolvido em Alegre, inferior ao de Maemba e Carapebus, diferenciou este local dos demais. A estrutura geológica, as condições atmosféricas, a proximidade das fontes de contaminação afetam as características físico-químicas dos sistemas aquáticos, bem como a concentração de elementos e compostos nos diferentes compartimentos (Namiesnik e Rabajczyk, 2010), como observado nos

locais estudados: Alegre, Maemba e Carapebus. Eles também afetam a especiação dos metais determinando suas interações com outros elementos na água, a solubilidade e, conseqüentemente, a disponibilidade do metal para a biota aquática e a toxicidade (Fericola et al., 2003, Namiesnik e Rabajczyk, 2010).

Em geral são esperados metais no sedimento; este compartimento tem um papel importante no ciclo geoquímico dos elementos. Neste local são depositadas substâncias com diferentes estruturas e propriedades, incluindo íons metálicos hidratados, metais adsorvidos em partículas sólidas ou compostos complexos e, transformações químicas e bioquímicas decorrentes da atividade de microrganismos (Motorelli et al., 2009). Os metais são contaminantes persistentes e podem migrar do sedimento para a fase aquática dependendo das condições físico-químicas do ambiente. Oxigênio dissolvido no meio aquático, principalmente inferior a  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ , é considerado como hipóxia ambiental severa, favorece o aumento da concentração de metais na coluna d'água ao mobilizar os do sedimento (Liu et al., 2019). A hipóxia severa aumenta as concentrações de Pb, Cd, Cu e Cr, e a alta salinidade influencia na mobilidade do As, aumentando sua concentração na coluna d'água (Liu et al., 2019). Por outro lado, altos níveis de  $\text{O}_2$  favorecem a precipitação de metais como óxido, hidróxido ou carbonato (Hopkinson e Barbeau, 2007; Namieśnik e Rabajczyk, 2010).

Considerando a distribuição de metais/metaloides em Alegre, e nas lagoas Maemba e Carapebus, as maiores concentrações de metais na água (Al, Ti, Mn, Fe, Ni, Ba, La, Ce) e sedimento (Al, Ti, V, Fe, Rb, Y, Ag, Ba, La, Ce e Pb) em Alegre está associado, em parte, a constituição geoquímica do solo (Cunha, 2018) e possível contaminação por material particulado proveniente da extração de mármore e granito nesta região. Em Carapebus, a alta concentração de alguns metais no sedimento (V, Cr, Fe, As, Sr e Bi) provavelmente está associada à intensa atividade metalúrgica da Região Metropolitana da Grande Vitória, que inclui a produção de aço e outras ligas metálicas e a pelotização e exportação de minério de ferro no complexo industrial de Tubarão. Tais atividades aumentam a carga metálica no ambiente e conseqüentemente, nos corpos aquáticos, porém apenas em Alegre, as concentrações de Al e Fe ficaram acima da concentração máxima recomendada pela resolução CONAMA 357 (CONAMA, 2005) para a preservação da biota aquática (águas classes 1 e 2) entre os metais (As, Ba, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Ni, Se, V e Zn) incluídos nesta resolução. Contaminantes metálicos emergentes como Ti, Y, Sr, La,

Ba, Ce encontrados em água e sedimentos não estão incluídos na Resolução CONAMA 357 de 2005.

A salinidade pode interagir com compostos dissolvidos na água contribuindo para a variação de sua toxicidade e afetar a mobilidade do metal do sedimento para a coluna d'água (Cañedo-Arguelles e Schäfer, 2018). O aumento da salinidade promove a mobilidade de As (Liu et al., 2019), Cd, Mn, Cu e Pb (Acosta et al., 2011, Zhao et al., 2013). A salinidade influencia a concentração de íons nos fluidos corporais dos peixes implicando em custo energético para manutenção do equilíbrio iônico (Cañedo-Arguelles e Schäfer, 2018) o que pode ter efeitos negativos pela redução da ingestão alimentar (Souke, 2007), baixa taxa de crescimento e sobrevivência (Hintz e Relyea, 2017) e malformações (Chinathamby et al., 2006). Em relação ao pH da água que é um fator importante para a sobrevivência da biota aquática (pH 6,5 - 8,5) (Iskandar et al., 2023) o pH foi elevado em Maemba-M2 também afeta a disponibilidade de metais. Ambientes alcalinos comprometem o transporte de íons e a excreção de amônia (Laurent et al., 2000). O pH influencia a disponibilidade do metal, muitos metais são insolúveis em pH neutro ou básico, favorecendo assim a adsorção pela matéria orgânica e acumulando-se em sedimentos (Walker et al., 2005), porém, em níveis de pH mais ácidos, esses metais podem ser liberados na água, tornando-os biodisponíveis para a biota (Gaur et al., 2005).

Considerando os metais presentes na água e no sedimento de Alegre, Maemba e Carapebus, eram esperados a presença desses metais no sangue das tilápias que vivem nesses locais. A absorção de metais pode ser feita pelas brânquias, diretamente da água via respiração e/ou do sedimento, pois esta espécie forrageia o sedimento a procura de alimento. Os metais no plasma e nas células sanguíneas podem afetar a estrutura das células e sua função.

A tilápia-do-nilo é conhecida por ser uma espécie de peixe altamente tolerante às condições ambientais adversas. O maior  $Kn$  dos peixes de Alegre e Carapebus (1,053 (0,913 - 1,190) e 1,050 (0,908 - 1,125), respectivamente) indica melhor condição que os coletados em Maemba-M1. O  $Kn$  está relacionado com altas reservas de energia nos peixes, sugerindo abundante disponibilidade de alimentos (Alberto et al., 2005). Em Alegre, local de cultivo desta espécie de peixe e em Carapebus, lagoa urbana, o esgoto doméstico rico em matéria orgânica e as condições salobras da lagoa podem favorecer o crescimento dos peixes como já enfatizado por Alvarenga et al., (2018). Em geral, a poluição tem um efeito negativo sobre o  $Kn$ , pois aumenta a demanda

energética para manter a higidez e/ou pode diminuir a disponibilidade de alimentos, exceto no caso de esgoto doméstico não tratado que fornece grande quantidade de matéria orgânica favorecendo altos níveis de produtividade (Alberto et al., 2005).

Embora o *Kn* tenha apresentado boa condição dos peixes, a concentração de metais nas células sanguíneas e no plasma de *O. niloticus* evidenciou contaminação dos peixes e os biomarcadores sanguíneos mostraram ajustes hematológicos para manter a capacidade de transporte de O<sub>2</sub> e alterações na capacidade imune inata e nível de estresse. Além disso, os eritrócitos dos peixes coletados em Alegre exibiram genotoxicidade e os de *Carapebus* exibiram mutagenicidade. Em geral, os biomarcadores sanguíneos são influenciados por fatores intrínsecos como idade, nutrição, reprodução e fatores externos como nível de O<sub>2</sub>, pH, salinidade e a presença de contaminantes, como os metais, que dependendo da sua concentração pode resultar em alterações nesses biomarcadores (Burgos-Aceves et al., 2019, Ibrahim e ElSayed, 2023).

Considerando esses fatores, o maior número de hemácias e mais alta concentração de Hb nos eritrócitos dos peixes de Alegre sugere resposta fisiológica à baixa concentração de O<sub>2</sub> dissolvido uma vez que os peixes precisam manter o metabolismo aeróbico. Baixo nível de O<sub>2</sub> dissolvido na água induz tais alterações para substituir Hb oxidadas ou desnaturadas de forma a aumentar a captação de O<sub>2</sub> (Mallya, 2007, Xia et al., 2016; Affonso et. al. 2002, Abdel-Tawwab et al., 2014, 2015; Ibrahim e ElSayed, 2023). Por outro lado, a baixa concentração de Hb, baixo HCM e CHCM nos eritrócitos dos peixes de Maemba-M1 caracterizou anemia normocítica hipocrômica. Embora a anemia possa ser avaliada por Hct inferior a 20% (Claus et al., 2008), os peixes de todas as lagoas e de Alegre não apresentaram Hct inferior a 20%, o que sugere que a baixa concentração de Hb e o HCM e CHCM devem também ser avaliados para diagnosticar anemia em peixes. Anemia também foi detectada em peixes coletados em reservatórios com altos níveis de Mn e Pb (Arnaudov e Tomova, 2008) Cd, Cr, Ni e Pb (Abdulnabi, 2020; Ghosh e Saha, 2023). Entretanto, a anemia nos peixes de Maemba-M1 pode não estar diretamente relacionada com metais na água, sedimentos e, mesmo com metais nos eritrócitos e plasma, uma vez que não foram encontradas correlações entre estes dados e metais.

Embora ENAs tenham sido encontrados em níveis elevados nos peixes de Alegre e Maemba, o micronúcleo nos eritrócitos foi maior nos peixes de *Carapebus*, sugerindo a presença de elemento mutagênico no ambiente. Micronúcleo foi induzido

em *Channa Punctatus* exposto à As, Ni, Cd e Cr (Singh et al., 2019). Neste estudo, o micronúcleo foi associado aos metais Ag, Nb, Sn e Sr nos eritrócitos dos peixes das lagoas Maemba ponto 2 e Carapebus.

Os leucócitos totais são um parâmetro importante para avaliar o estado imunológico dos peixes e a porcentagem diferencial deles indica doença infecciosa e/ou condição inflamatória (Tavares-Dias et al, 2013; Soares et al, 2022). Os linfócitos são os leucócitos mais abundantes em peixes e estão envolvidos na resposta imune a patógenos (El-Sayed et al., 2007; Saudauskas-Henrique et al., 2011), os *basófilos* são os menores leucócitos e também relacionados a sistema imunológico, os neutrófilos são fagócitos e são recrutados para o local inflamatório por quimiocinas (Katzenback e Belosevic , 2009; Havixbeck e Barreda, 2015), os *eosinófilos* são eficazes no controle de infecções parasitárias e os *monócitos* contribuem para populações de macrófagos residentes nos tecidos durante condições inflamatórias (Hashimoto et al., 2013; Varol et al., 2015). Mudanças em suas porcentagens no sangue periférico estão associadas a alterações no sistema imune dos peixes e podem indicar doenças em peixes (Seriani et al., 2015).

Em geral, em Alegre, o número total e a porcentagem dos diferentes tipos de leucócitos estavam na faixa encontrada em *O. niloticus* em cultivo intensivo (Tavares-Dias e Mariano, 2015) sugerindo que os metais presentes no sangue não estão afetando diretamente a capacidade imunológica dos peixes. Entretanto, o total de leucócitos dos peixes de Maemba-M1 indica alterações no sistema imunológico. As variações de alguns tipos de leucócitos em peixes de ambiente natural, como em Maemba e Carapebus, podem estar relacionadas à possível deficiência de alimentos e/ou de alguns nutrientes no ambiente bem como à presença de metais e outros contaminantes. A maior porcentagem de linfócitos nos peixes de Maemba (M1 e M2) e de Carapebus sugere processo inflamatório. Aumentos de linfócitos foram relatados no sangue de *O. niloticus* exposto à mistura de metais presentes no MPASe de origem metalúrgica por 96 h (Soares et al., 2022). A neutropenia nos peixes de Maemba-M2 e Carapebus sugere a presença de parasitas (Furtado et al., 2019) o que é reforçado pela presença de elevada porcentagem de eosinófilos que também estão associados à presença de parasitas (Martins et al., 2004). Alguns metais como o Pb, pesticidas e nonilfenóis podem comprometer a imunocompetência dos peixes (Witeska, 2005, Segner et al., 2022). Os trombócitos estão relacionados à hemostasia (coagulação do sangue) e como fagócitos no processo de infecção em peixes (Tavares-Dias, 2003;

MARTINS et al., 2004). O total de trombócitos variou no sangue dos peixes de todas as lagoas, sendo que nos peixes de Maemba-M1 sugerem uma resposta conjunta aos linfócitos no foco inflamatório.

A atividade respiratória de leucócitos resulta da fagocitose, gera espécies reativas de oxigênio e está relacionada à ativação do sistema imunológico contra agente patogênico (Jorgensen e Robertsen, 1995, Raida e Buchmann, 2009, Mohanty e Sahoo, 2010). No presente estudo, o surto respiratório nos leucócitos ocorreu em peixes provenientes de lagoas próximas às indústrias metalúrgicas. Porém, em *O. niloticus* exposto ao MPASe, por 96 h, a atividade respiratória dos leucócitos diminuiu (Soares et al., 2022). Possivelmente, esta maior atividade nos peixes das lagoas esteja relacionada a outros contaminantes, já que essas lagoas recebem esgoto doméstico e há intensa atividade de pesca e lazer o que pode aumentar a presença de patógenos.

Os níveis de lisozima no soro estão relacionados a infecções e processos inflamatórios, bem como à exposição ao MPASe conforme apontado por Soares et al. (2022). O nível mais elevado de lisozima nos peixes de Maemba-M1 foi relacionado com alguns processos inflamatórios nestes peixes juntamente com o maior número de leucócitos.

O estresse em peixes pode ser identificado pelos biomarcadores fisiológicos cortisol e glicose; o aumento do cortisol é a resposta primária (Wendelaar Bonga, 1997) seguido pelo aumento da glicose para suportar o aumento da demanda energética (Iwama et al., 1999; Mommsem et al., 1999). A exposição de *O. niloticus* ao MPASe aumentou os níveis de cortisol e glicose (Soares et al., 2022; Adorno et al., 2023). Nos peixes das lagoas, o nível de cortisol sugere um ambiente mais estressante que o de Alegre, mas os níveis de glicose foram maiores apenas nos peixes da Maemba-M1. Apesar disso, os níveis de glicose foram 3 vezes superiores aos descritos por Soares et al. (2022) e Adorno et al. (2023) o que pode estar relacionado a diferentes demandas energéticas em peixes em ambiente natural, como forrageamento, fuga de predadores e outros desafios.

A análise dos biomarcadores sanguíneos e metais na água, sedimento, eritrócitos e plasma nas análises multivariadas permitiu diferenciar Alegre das lagoas Maemba e Carapebus assim como os biomarcadores mais associados a cada local. Embora os metais sejam conhecidos por desencadear variações em diferentes tipos de biomarcadores, as análises multivariadas revelaram que a maioria dos biomarcadores

utilizados neste estudo não apresentaram forte correspondência com os metais nos eritrócitos e no plasma sanguíneo o que pode ser explicado por concentrações que não induziram alterações celulares e/ou interações que contribuíram para reduzir a ação dos metais nas células sanguíneas; ou ainda outras possíveis fontes de contaminação. Isso enfatiza a necessidade de considerar outras potenciais fontes de contaminação, provenientes das atividades em torno das lagoas e de Alegre.

## 5. Conclusão

Embora a interpretação dos fatores bióticos com os fatores abióticos na fisiologia do sangue dos peixes seja complexa, é possível observar como as respostas podem ser diferentes em ambientes influenciados por diferentes fontes de contaminação. Embora Alegre esteja localizada em um centro de aquicultura, este local foi o que apresentou maior concentração de metais na água e sedimento, o que mostra a dificuldade de encontrar ambientes de referência em estudos de campo. Porém, os peixes de Alegre apresentaram respostas diferentes das demais lagoas, indicando um ambiente menos desafiador. As lagoas Maemba e Carapebus, por sua vez, por estarem localizadas dentro dos centros urbanos, são mais influenciadas pelas atividades antrópicas ao seu redor e das atividades metalúrgicas, o que se reflete nos peixes, uma vez que apresentaram anemia e mutagenicidade além de alterações nas respostas imunológicas. Comparando as lagoas, é possível observar uma resposta mais acentuada nos peixes coletados em lagoas próximas às atividades metalúrgicas. Assim, o presente estudo confirma a hipótese de que os peixes localizados em lagoas próximas a centros urbanos e indústrias metalúrgicas são influenciados por seus efluentes e contaminantes do seu entorno. No entanto, é difícil dizer com certeza quais fontes são as principais contribuintes para essas alterações fisiológicas. Embora este estudo tenha como foco o acúmulo de metais em *O. niloticus*, a presença de outros fatores não pode ser ignorada, como efluentes domésticos, matéria orgânica, microplásticos, entre outros possíveis contaminantes que podem ter efeito sinérgico ou antagônico nas variáveis sanguíneas de *Oreochromis niloticus*.

## Referências

- ABDEL-KHALEK, A.A., BADRAN, S.R., MARIE, M.A.S., 2016. Toxicity evaluation of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using hematological, bioaccumulation and histological biomarkers. **Fish Physiology and Biochemistry**. 42, 1225–1236, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0212-8>
- ABDEL-TAWWAB, M., EL-SAYED, G.O., SHADY, S.H.. Effects of dietary protein levels and environmental zinc exposure on the growth, feed utilization, and biochemical variables of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Toxicological & Environmental Chemistry**. 94, 1368–1382, 2012. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.703202>
- ABDEL-TAWWAB, M., HAGRAS, A.E., ELBAGHDADY, H.M., MONIER, M.N.. Dissolved oxygen level and the effects of stocking density on growth, feed utilization, physiology and innate immunity of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**. 26, 340–355, 2014. <https://doi.org/10.1080/10454438.2014.959830>
- ABDEL-TAWWAB, M., HAGRAS, A.E., ELBAGHDADY, H.M., MONIER, M.N.. Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. **Aquaculture International**. 23, 1261–1274, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9882-y>
- ABDEL-TAWWAB, M., MONIER, MN, HOSEINIFAR, SH et al. Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. **Fish Physiology and Biochemistry**. 45, 997–1013, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00614-9>
- ABDULNABI, BULKASIM.. Effect of heavy metals pollution on some hematological parameters and morphology of red blood cells in *Oreochromis niloticus* (L.) in Lake Maryut. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**. 11 (4), 6565-6574, 2020. ISSN: 0976-7126
- ACOSTA, J.A., JANSEN, B., KALBITZ, K., FAZ, A., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.. Salinity increases mobility of heavy metals in soils. **Chemosphere**. 85 (8), 1318–1324, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.046>
- AFFONSO, E.G., POLEZ, V.L., CORREA, C.F., MAZON, A.F., ARAUJO, M.R., MORAES, G., RANTIN, F.T.. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 133, 375–382, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00127-8)
- ALBERTO A., CAMARGO A.F, VERANI J.R., COSTA O.F., FERNANDES M.N.. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 61 (2), 247–255, 2002. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.08.009>

ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., NOVELLI, E.L.. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**. 27(8) 673-679, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00127-1)

ALVARENGA, E.R., ALVES, G.F.O, FERNANDES, A.F.A., COSTA, G.R., SILVA, M.A., TEIXEIRA, E.A., TURRA, E.M.. Moderate salinities enhance growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in the biofloc system. **Aquaculture Research**. 49 (9), 2919-2926, 2018. <https://doi.org/10.1111/are.13728>

AMORIM, N.P.L., DE ASSIS, R.A., DOS SANTOS, C.G.A., BENVINDO-SOUZA, M., BORGES, R.E., DE SOUZA SANTOS, L.R.. Erythrocyte Recovery in *Oreochromis niloticus* Fish Exposed to Urban Effluents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 112(1):15, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03833-2>

ARNAUDOV, A.D.A., TOMOVA, E.. Selected hematological indices of freshwater fish from StudenKladenetsh reservoir. **Bulgarian Journal of agricultural Science**. 14 (No 2). 244-250, 2008.

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.. Concentrations, bioaccumulation, and health risk assessments of heavy metals in fishes from Nigeria's freshwater: a general overview. **Environmental Science and Pollution Research**, 29, 82660-82680, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23390-1>

BAPTISTA VENTURA, L.M., DE OLIVEIRA PINTO, F., GIODA, A., DE ALMEIDA D'AGOSTO, M.. Inspection and maintenance programs for in-service vehicles: an important air pollution control tool. **Sustainable Cities and Society**. 53, 101956, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2019.101956>

BILLER-TAKAHASHI, J., TAKAHASHI, L., SAITA, M., GIMBO, R., URBINATI, E.. Leukocytes respiratory atividade respiratória de leucócitos activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**. 73, 425–429, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>

BURGOS-ACEVES, M.A., LIONETTI, L., FAGGIO, C.. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. **Science of The Total Environment**. 670, 1170–1183, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.275>

CAÑEDO-ARGUELLES, M., KEFFORD, B., SCHÄFER, R.. Salt in freshwaters: causes, effects and prospects - introduction to the theme issue. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 374, 2019. <http://doi.org/10.1098/rstb.2018.0002>

CECCHINI, S., CAPUTO, A.R.. Acid–base balance in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to water oxygen concentration. **Aquaculture Research**. 34, 1069–1073, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00911.x>

CHEN, Y. G., HUANG, J. H., LUO, R., GE, H. Z., WOŁOWICZ, A., WAWRZKIEWICZ, M., GŁADYSZ-PŁASKA, A., LI, B., YU, Q. X., KOŁODYŃSKA, D., LV, G.Y.. 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, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112336>

CHINATHAMBY, K., REINA, R.D.A., BAILEY, P.C.E., LEES, B.K.. Effects of salinity on the survival, growth and development of tadpoles of the brown tree frog, *Litoria ewingii*. Austrália. **Australian Journal of Zoology**. 54, 97-105, 2006. <https://doi.org/10.1071/ZO06006>

CHOVANEC, A., HOFER, R., SCHIEMER, F.. Fish as bioindicators. In: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), **Trace Metals and other Contaminants in the Environment**. 6, 639–676, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80148-0](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80148-0)

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic Disorders of fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. 11, 445-462, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>

DORNFELD, C. B.. Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). Tese (Doutorado) - Departamento de Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Usp, São Paulo, 2002. <https://doi.org/10.11606/D.18.2002.tde-14072005-153541>

DURUIBE, J.O., OGWUEGBU, M.O., EGWURUGWU, J.N. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**. 2, 112–118, 2007. WOS: 000260582600001

EL-SAYED, Y.S., SAAD, T.T., EL-BAHR, S.M.. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 24, 212–217, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.05.006>

EVANS, J.J., SHOEMAKER, C.A., KLESIUS, P.H.. Effects of sublethal dissolved oxygen stress on blood glucose and susceptibility to *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Aquatic Animal Health**. 15, 202–208, 2003. <https://doi.org/10.1577/H03-024>

FERNICOLA, N.A.G.G., BOHRER-MOREL, M.B.C., BAINY, A.C.D.. Ecotoxicologia. In: Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M. (Eds.), **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**, first ed. Editora Rima, São Carlos, pp. 221 e 242, 2003.

FONTENELE, A. P. G.; PEDROTTI, J. J.; FORNARO, A. Evaluation of trace metals and major ions concentrations in rainwater in downtown São Paulo city. **Química Nova**, v. 32 (4), p. 839-840, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400003>

FURTADO, W.E.; CARDOSO, L.; FIGUEREDO, A.B.; MARCHIORI, N.C.; MARTINS M.L.. Histological and hematological alterations of silver catfish *Rhamdia quelen* highly

parasitized by *Lernaea cyprinacea*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 135, 157-168, 2019. <https://doi.org/10.3354/dao03386>

GALLAGE, S., KATAGIRI, T., ENDO, M., MAITA, M.. Comprehensive evaluation of immunomodulation by moderate hypoxia in *S. agalactiae* vaccinated Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**. 66, 445–454, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.041>

GARAI, P., BANERJEE, P., MONDAL, P., SAHA, N. C.. Effect of heavy metals on fishes: Toxicity and bioaccumulation. **Journal of clinical toxicology**, v. 11, S18:001, 2021. DOI: 10.35248/2161-0495.21.s18.001

GAUR, V.K., GUPTA, S.K., PANDEY, S.D., GOPAL, K. AND MISRA, V.. Distribution of Heavy Metals in Sediment and Water of River Gomti. **Environmental Monitoring and Assessment**. 102, 419 – 433, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-6395-6>

GAUTAM, P. K., GAUTAM, R. K., BANERJEE, S., CHATTOPADHYAYA, M. C., AND PANDEY, J. D.. Heavy metals in the environment: Fate, transport, toxicity and remediation technologies, 60. Hauppauge, New York, United States: Nova Science Publishers, 101–130, 2016.

GHOSH, D.E., SAHA, S.K.. Assessment of the Toxic Effect of Hexavalent Chromium on the Hematological Indices in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Advanced Zoology**. 44(S3), 282–293, 2023. <https://doi.org/10.17762/jaz.v44iS-3.597>

HINTZ, W.D., RELYEA, R.A.. Impacts of road deicing salts on the early-life growth and development of a stream salmonid: Salt type matters. **Environmental Pollution**. 223, 409-415, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.040>  
[doi:10.1016/j.envpol.2017.01.040](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.040)

HOPKINSON, B.M., BARBEAU, K.A.. Organic and redox speciation of iron in the eastern tropical North Pacific suboxic zone. **Marine Chemistry**. 105, 2-17, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.02.008>

IBRAHIM, L.A., ELSAYED, E.E.. The Influence of Water Quality on Fish Tissues and Blood Profile in Arab al-Ulayqat Lakes, Egypt. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**. 49, 235-243, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2023.01.006>

ISKANDAR, A., HASAN, Z., SUNARDI, S.. Species composition and community structure of freshwater fish in a newly inundated reservoir, Sumedang Regency, West Java, Indonesia. **AACL Bioflux**. 16. 1577-1590, 2023.

LAURENT, P., WILKIE, M.P., CHEVALIER, C., WOOD, C.M.. The effect of highly alkaline water (pH 9.5) on the morphology and morphometry of chloride cells and pavement cells in the gills of the freshwater rainbow trout: relationship to ionic transport and ammonia excretion. **Canadian Journal of Zoology**. 78 (2): 307-319, 2000. <https://doi.org/10.1139/z99-207>

LIU, J.-J., DIAO, Z.-H., XU, X.-R., & XIE, Q.. Effects of dissolved oxygen, salinity, nitrogen and phosphorus on the release of heavy metals from coastal sediments.

**Science of The Total Environment.** 666, 894-901, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.288>

MALLYA, Y.J.. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. **Kingolwira National Fish Farming Centre.** UNU - Fisheries Training Programme, 30 pp, 2007.

MARTINS, M. L., TAVARES-DIAS, M., FUJIMOTO, R. Y., ONAKA, E. M., & NOMURA, D. T.. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia.** 56(5), 640–646, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000500011>

MASINDI, V., AND MUEDI, K. L.. Environmental contamination by heavy metals, in **Heavy metals.** Editors H. E.-D. M. Saleh and R. F. Aglan (London, UK: IntechOpen), 115–132, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76082>

MOROZESK, M., SOUZA, I.C., FERNANDES, M.N., SOARES, D.C.F.. Airborne particulate matter in an iron mining city: characterization, cell uptake and cytotoxicity effects of nanoparticles from PM2.5, PM10 and PM20 on human lung cells. **Environmental Advances.** 6, 100125, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100125>

MOUILLOT, D., LAUNE, J., TOMASINI, JA. ALIAUME, C., BREHMER, P., DUTRIEUX, E., DO CHI, T.. Assessment of Coastal Lagoon Quality with Taxonomic Diversity Indices of Fish, Zoobenthos and Macrophyte Communities. **Hydrobiologia.** 550, 121–130, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-4368-y>

NAMIEŚNIK, J. E RABAJCZYK, A.. The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments. **Chemical Speciation & Bioavailability.** 22 (1), 1-24, 2010. <https://doi.org/10.3184/095422910X12632119406391>

NETO A.F., PASSOS D., COSTA J.L., COSTA M.J., CAÇADOR I., PEREIRA M.E., DUARTE A.C., PACHECO M., DOMINGOS I.. Metal concentrations in the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*, in estuaries and coastal lagoons from Portugal. *Vie Milieu* 61: 167–177, 2011.

POWERS, D.A.. Fish as model systems. **Science** 246, 352-358, 1989. Doi: 10.1126/science.2678474

PLESSL, C., OTACHI, E.O., KÖRNER, W., AVENANT-OLDEWAGE, A., JIRSA, F.. Fish as bioindicators for trace element pollution from two contrasting lakes in the eastern Rift Valley, Kenya: spatial and temporal aspects. **Environmental Science and Pollution Research.** 24, 19767–19776, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9518-z>

RIMA (2017) UTEI Vitória - Relatório de Impacto Ambiental

ROSENZWEIG, A.. **Metallochaperones: bind and deliver.** **Cell Chemical Biology.** 9, 673–677, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00156-4)

SEIBEL, H., BARSMANN, B., AND REBL, A.. Blood will tell: What hematological analyses can reveal about fish welfare. **Frontiers in Veterinary Science**. 8, 616955, 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.616955>

SILVA, A.F; VIEIRA, C. A.. Levantamento das Emissões de Material Particulado Provenientes de Fontes Estacionárias de Indústria Metalúrgica, um Estudo De Caso. **Revista Brasileira de Gestão e Engenharia** – ISSN 2237-1664. Centro de Ensino Superior de São Gotardo. Vol: 1; N: 3; p. 23 – 35, 2018. Disponível em: <https://periodicos.cesg.edu.br/index.php/gestaoeengenharia/article/view/417>. Acesso em: 10 de Maio de 2023.

SILVA, N.S.. Efeito da urbanização nas características geoquímicas da laguna de Carapebus - Serra/ES. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo – Brasil. 2018.

SOARES, M. P; DE ANGELIS, C. F; CARDOSO, I. L.; MCKENZIE, D.J.; SOUZA, I.S.; WUNDERLIN, D.A.; MONFERRÁN, M.V.; FERNANDES, M.N; LEITE, C.A.C. Settleable atmospheric particulate matter induces stress and affects the oxygen-carrying capacity and innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative biochemistry and physiology c-toxicology & pharmacology**. 257, 109330, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109330>

SANTOS, J. M.; JUNIOR, N. C. R.; GALVÃO, E. S. **Material particulado na atmosfera urbana e suas interações com a saúde humana**. Goiânia: Editora: Alta Performance – 1º edição, 2022.

SANTOS, J.M., REIS, N.C., GALVÃO, E.S., SILVEIRA, A., GOULART, E.V., LIMA, A.T.. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**. 24, 22026–22039, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9677-y>

SARAVANAN, M., KUMAR, K.P., RAMESH, M.. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 100,206–211, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.002>

SADAUSKAS-HENRIQUE, H., SAKURAGUI, M.M., PAULINO, M.G., FERNANDES, M.N.. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. **Environmental Monitoring and Assessment**. 181, 29–42, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1810-z>

SEGNER, H., REHBERGER, K., BAILEY, C., BO, J.. Assessing fish immunotoxicity by means of in vitro assays: are we there yet? **Frontiers in Immunology**. V:13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835767>

SERIANI, R., ABESSA, D.M.S., MOREIRA, L.B., CABRERA, J.P.G., SANCHES, J.Q., SILVA, C.L.S., AMORIM, F.A., RIVERO, D.H.R.F., SILVA, F.L., FITORRA, L.S., CARVALHO-OLIVEIRA, R., MACCHIONE, M., RANZANI-PAIVA, M.J.T.. In vitro mucus transportability, cytogenotoxicity, and hematological changes as non-destructive

physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 112, 162–168, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.003>

SHAHJAHAN, M., KHATUN, M.S., MUN, M.M., ISLAM, S.M.M., UDDIN, M.H., BADRUZZAMAN, M., KHAN, S.. Nuclear and cellular abnormalities of erythrocytes in response to thermal stress in common carp *Cyprinus carpio*. **Frontiers in Physiology**. v: 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00543>

SINGH, M., KHAN, H., VERMA, Y. RANA, S.V.S.. Distinctive fingerprints of genotoxicity induced by As, Cr, Cd, and Ni in a freshwater fish. **Environmental Science and Pollution Research**. 26, 19445–19452, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05274-z>

SOLIS, J.C., SANTERRE, A., P´EREZ, M.I.G., OROZCO, R.R., ZAITSEVA, G.. A comparative study of phagocytic activity and lymphoproliferative response in five varieties of tilapia *Oreochromis* spp. **Journal of Fish Biology**. 71, 1541–1545, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01601.x>

SOUCEK, D.J.. Sodium sulfate impacts feeding, specific dynamic action, and growth rate in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. **Aquatic Toxicology**. 83, 315-322, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.05.006>

SOUZA I.C, DUARTE ID, PIMENTEL NQ, ROCHA LD, MOROZESK M, BONOMO MM, AZEVEDO VC, PEREIRA CD, MONFERRÁN MV, MILANEZ CR, MATSUMOTO ST, WUNDERLIN DA, FERNANDES MN. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**. 180, 136-144, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.017>

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.. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Science of The Total Environment**. 640-641, 501–511, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.302>

SOUZA, I.C., MOROZESK, M., MANSANO, A.S., MENDES, V.A.S., AZEVEDO, V.C., MATSUMOTO, S. T., ELLIOT, M., MONFERR´AN, M.V., WUNDERLIN, D.A., FERNANDES, M.N.. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. **Science of The Total Environment**. 753, 141976, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141976>

TAVARES-DIAS, M., BOZZO, F.R., SILVA SANDRIN, E.F., DE CAMPOS-FILHO, E., DE MORAES, F.R.. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (*Cyprinidae*) na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. 26, 73–80, 2004. <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v26i1.1661>

TAVARES-DIAS, M., PÁDUA, S.B., PAIVA, M.J.T.R., EGAMI, M.I.. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Brasil: Editora da Universidade Estadual de Maringá. 2013

TAVARES-DIAS, M., MARIANO, W.S.. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: Editores, P.eJ. (Ed.), **Aquicultura No Brasil: Novas Perspectivas**, pp. 10–30. São Carlos. 2015.

VIEIRA, C.E.D.; MARQUES, J.A.; SILVA, N.G.; BEVITÓRIO, L.Z.; ZEBRAL, Y.D.; MARASCHI, A.C.; COSTA, S.R.; COSTA, P.G.; DAMASCENO, E.M.; PIROVANI, J.C.M.; VALE-OLIVEIRA M.; SOUZA, M.M; MARTINS, C.M.; SANDRINI, A.B.; SANDRINI, J.Z.. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. **Science of The Total Environment**. V: 832, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>

VICENTE-MARTORELL, J.J., GALINDO-RIANˆO, M.D., GARCÍ'A-VARGAS, M. AND GRANADO-CASTRO, M.D.. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. **Journal of Hazardous Materials**, 162, 823– 836, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.106>

XIA, M., CHAOY, J.J., LI, C., KONG, Q., ZHAO, Y., GUO, S., QI, D.. Changes of hemoglobin expression in response to hypoxia in a Tibetan schizothoracine fish, *Schizopygopsis pylzovi*. *Journal of Comparative Physiology B*. 186:1033–1043, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1013-1>

WALKER, C.H., HOPKIN, S.P., SIBLY, R.M. AND PEAKALL, D.B. (2005) **Principles of ecotoxicology**, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2005. ISBN 9781439862667

WINTROBE, M.M.. **Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates**. *Folia Haematologie* 51, 32–49, 1934.

WITESKA, M., KONDERA, E., LUGOWSKA, K., & BOJARSKI, B.. Hematological methods in fish – Not only for beginners. **Aquaculture**, 547, 737498, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737498>

ZHAO, S., FENG, C., WANG, D., LIU, Y. E SHEN, Z.. Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: Relative role of sediments' properties and metal speciation. **Chemosphere**. 91(7), 977–984, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.001>

ZANUZZO, F.S., URBINATI, E.C., RISE, M.L., HALL, J.R., NASH, G.W., GAMPERL, A.K.. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**. 435, 1–9, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.010>

## CAPÍTULO III

---

### ANÁLISES DOS MECANISMOS OSMORREGULADORES

REGULAÇÃO IÔNICA EM *OREOCHROMIS NILOTICUS* EM LAGOAS DO  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL, INFLUENCIADAS POR ATIVIDADES INDUSTRIAIS  
EM SEU ENTORNO

Luana B Carvalho 1,2

1 Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais - PPGERN

2 Departamento de Ciências Fisiológicas – DCF

## RESUMO

As águas residuais e emissão de poluentes industriais e domésticos afetam os ecossistemas. No Brasil, a atividade de indústrias de pelotização e exportação de minério de ferro é acentuada no estado do Espírito Santo, pela presença do Complexo de Tubarão e de Ubu. O presente estudo teve como objetivo investigar os ajustes para a manutenção da regulação osmótica e iônica e equilíbrio ácido-base nas brânquias e nos rins, assim como a osmolalidade e a concentração de íons plasmáticos de *Oreochromis niloticus* coletados nas lagoas Maemba (ponto M1 e M2) e Carapebus, próximas a esses complexos, e em um sistema de aquicultura localizado em Alegre, cidade distante desses Complexos industriais. A concentração de metais na água e no sedimento nos locais de coleta e nas brânquias e rins de *O. niloticus* desses ambientes foram quantificados, e biomarcadores bioquímicos e morfológicos relacionados a regulação iônica foram analisados nos peixes coletados. Os peixes de Alegre apresentaram a maior área de ionócitos no rim. Os peixes de Maemba-M1 apresentaram a maior área fracional de ionócitos na brânquia, possivelmente para favorecer a absorção de íons, e a maior atividade da anidrase carbônica no rim. Os peixes de Maemba-M2 e Carapebus apresentaram respostas dos biomarcadores renais semelhantes, apesar de terem sido coletados em locais com características distintas. Os peixes de Maemba-M1 apresentaram a menor concentração de  $K^+$  no plasma e a menor osmolalidade, entretanto, os valores estavam dentro da faixa de osmolalidade em teleósteos, assim como os peixes dos outros locais de coleta. Dessa forma, apesar dos peixes enfrentarem desafios diferentes, os ajustes observados para a manutenção da regulação osmótica e iônica foram eficazes. Esperávamos que diferentes locais desencadeassem mecanismos diferentes, porém, apesar de Maemba ponto 2 e Carapebus apresentarem características distintas, as respostas observadas nos biomarcadores renais foram semelhantes. Este estudo destaca a complexibilidade das interações nos ambientes naturais e a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os mecanismos osmorregulatórios em peixes de lagoas próximas a atividades metalúrgicas. Sendo assim, em estudos de monitoramento ambiental, é essencial utilizar múltiplos biomarcadores para avaliar os efeitos nesses mecanismos.

**Palavras-chave:** Metalurgia. Osmolalidade. ATPases. Anidrase carbônica. Ionócitos. Brânquias. Rins.

## 1. Introdução

As águas residuais e emissão de poluentes industriais e domésticos em corpos hídricos acarreta danos ecológicos e perdas econômicas (Afolalu et al., 2022), o que faz com que essa problemática venha a ser alvo de estudos em todo o mundo (Morin-Crini et al., 2022). Esses estudos fornecem informações sobre a interação dos poluentes com os ecossistemas aquáticos, se tornando uma importante ferramenta para a determinação de padrões de qualidade e atualização da regulamentação das condições e padrões de lançamento de efluentes (Hommen et al., 2010).

O estado do Espírito Santo (Brasil), como outros locais, apresenta diversas fontes potenciais de poluição, envolvendo trânsito de veículos, lançamento de efluentes sem tratamento em corpos hídricos e, sendo um estado rico em recursos minerais, a presença de indústrias de extração de rochas ornamentais e de revestimento, pelotização e exportação de minério de ferro e produção de aço (Santos et al., 2017; Santos et al., 2022, Vieira e Menezes, 2015). Essas atividades aumentam o acúmulo de resíduos nos recursos hídricos podendo ser tóxicos a biota residente (El Zrelli et al., 2021; Gong et al., 2021). As lagoas são importantes pois são habitat de diferentes organismos, possibilitam o fornecimento de água às comunidades no seu entorno e são importantes para a economia, como fonte de renda para pescadores e de lazer para toda a comunidade. Em contrapartida, as lagoas atuam como sumidouro de poluentes, tendo como principais fontes de poluição as águas residuais industriais, domésticas e agricultura e fontes indiretas como a deposição de material particulado atmosférico emitidos por indústrias (Chen et al., 2017). Esses resíduos e a constante deposição de material particulado atmosférico sedimentável (partículas > 10  $\mu\text{m}$ ) é uma ameaça para a vida aquática, visto que o acúmulo e persistência de contaminantes nesse ambiente favorece um cenário de exposição crônica e, conseqüentemente, a possibilidade de bioacumulação de substâncias químicas nos organismos desses ecossistemas (Chen et al., 2019; Cui et al., 2020).

Na Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV) e Anchieta (Espírito Santo – Brasil) estão localizadas as lagoas Carapebus e Maemba, próximas a indústrias metalúrgicas, que além de resíduos domésticos, estão em área de influência de partículas atmosféricas sedimentáveis compostas por metais/metaloídes e nanopartículas metálicas (80%) e matéria orgânica (20%) liberadas pelas indústrias metalúrgicas (Souza et al., 2018, Soares et al 2022).

A utilização de biomarcadores para investigar a interação e efeito dessas atividades nos corpos hídricos se faz necessária e os peixes são ótimos modelos para esses estudos. Poluentes como metais/metaloídes e nanopartículas metálicas podem afetar a capacidade de regulação osmo-iônica dos peixes comprometendo o equilíbrio iônico e afetando funções vitais como contração muscular e transmissão de impulsos nervosos, além de gerar desidratação ou hiper-hidratação comprometendo a funcionalidade dos órgãos e até acarretar morte celular afetando todos os sistemas do organismo. Dessa forma, biomarcadores de regulação osmótica e iônica oferecem um panorama geral de como o ambiente pode estar afetando o equilíbrio interno dos peixes.

O primeiro órgão do peixe a entrar em contato com as substâncias químicas do meio são as brânquias, elas desempenham importantes funções, dentre elas as trocas gasosas e o transporte de íons. Além das brânquias, os rins também são um importante órgão relacionado a regulação osmótica e iônica. Células localizadas nas brânquias e nos rins especializadas em trocas iônicas são denominadas ionócitos. Essas células, atuam no transporte de íons, via enzimas do grupo ATPase, como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{H}^+$ -ATPase, que por meio da hidrólise do ATP, liberam energia que permite o transporte de íons contra um gradiente de concentração (Kultz e Somero, 1995; Fernandes et al., 2007). A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, atua no efluxo de íons  $\text{Na}^+$  e influxo de íons  $\text{K}^+$  celular contribuindo para manter o potencial de membrana e regulação do volume celular (Bianchini et al., 1999; Sancho et al., 2003). Em relação ao ambiente em que o animal vive, água doce ou salina, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase participa do influxo/efluxo de  $\text{Na}^+$  no organismo, via brânquias (Fernandes, 2020). A  $\text{H}^+$ -ATPase atua na regulação do pH intracelular, bombeando prótons (íons de  $\text{H}^+$ ) para fora da célula e criando uma força motriz para a entrada de  $\text{Na}^+$  (Evans et al., 2005).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie eurialina que se encontra distribuída em todo o território brasileiro, inclusive nas lagoas Maemba e Carapebus, e possui a capacidade de realizar ajustes fisiológicos que a permite habitar ambientes com diferentes desafios como as variações nos parâmetros físico-químicos da água. Dessa maneira, *O. niloticus* é considerada um modelo para estudos toxicológicos, e o uso de biomonitores permite uma melhor compreensão das condições do sistema aquático (Duarte et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de metais/metaloídeos na água e sedimento das lagoas Carapebus e Maemba localizadas próximas a indústrias metalúrgicas (pelotização e exportação de minério de ferro, produção de ligas metálicas) e possíveis efeitos na homeostasia osmo-iônica de *O. niloticus* coletados nessas lagoas e em local distante dessas indústrias.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Área de estudo

As coletas foram realizadas em duas lagoas costeiras na Região Metropolitana da Grande Vitória, que se localizam próximos a áreas de atividade industrial metalúrgica: lagoa Carapebus e Maemba, e um sistema de cultivo de peixes localizados na cidade de Alegre, a aproximadamente 146 km das indústrias metalúrgicas próximas a lagoa Carapebus e 98 km da lagoa Maemba.

A lagoa de Carapebus está localizada no município de Serra, litoral do estado do Espírito Santo e possui uma área de aproximadamente 0.4 km<sup>2</sup> com 1.69 m de profundidade. A lagoa é separada do mar por um banco de areia; em estação de chuvas ou períodos de maré alta, a água da lagoa faz contato com o mar, variando sua salinidade e tornando a água salobra. Por se encontrar em uma região urbana, a lagoa possui receptores de esgoto doméstico e é utilizada para lazer e pesca. A lagoa se encontra a aproximadamente 8 km de um complexo industrial de siderurgia onde ocorre processo de pelotização e exportação de minério de ferro e produção de ligas metálicas, o Complexo de Tubarão.

A lagoa Maemba está localizada no litoral sul do estado do Espírito Santo, na divisa dos municípios de Guarapari e Anchieta, a 65 km do Complexo de Tubarão; é a segunda maior lagoa do estado com aproximadamente 4.9 km<sup>2</sup> e profundidade média de 1.9 m. A lagoa está separada do oceano pela Rodovia do Sol e é caracterizada por ser constituída por água doce. Apesar da lagoa ser receptora de efluentes domésticos sem tratamento de algumas comunidades em suas margens, ela é utilizada como manancial de abastecimento, sendo tratada e distribuída pela companhia de abastecimento para as comunidades vizinhas. A lagoa está localizada ao lado da indústria de pelotização de minério de ferro, e recebe água direta da barragem norte, que é um reservatório de águas residuais dos processos internos da

indústria metalúrgica, inclusive da água utilizada no mineroduto responsável pelo transporte do minério de ferro do estado de Minas Gerais para o Espírito Santo.

O sistema de aquicultura em Alegre, está localizado no Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), campus Alegre. Apesar de se encontrar afastada das atividades metalúrgicas, Alegre possui outras fontes de influência, pois se encontra em uma região caracterizada pela exploração de mármore e granito.

Foram realizadas coletas de água, sedimento e peixes (*O. niloticus*) no mês de março de 2022, em cada lagoa: Carapebus (20°13'41" S 40°12'46" W), Maemba (M) em dois pontos: M1, a 1 km da barragem do reservatório de águas residuais da indústria metalúrgica (M1: 20°46'07" S 40°34'39" W) e M2, a 2 km da barragem (M2: 20°45'26" S 40°34'19" W) e, em Alegre (20°45' 33" S 41°27'13" W).

## 2.2. Coleta de água e sedimento:

A determinação dos parâmetros físico-químicos da água (salinidade, condutividade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH) de cada lagoa e Alegre foi feita utilizando sonda multiparâmetro (Horiba). Amostras de água e sedimento foram coletadas manualmente, em triplicata. As amostras de água foram coletadas à 20 cm abaixo da superfície e as de sedimento foram coletadas a 10 cm da superfície do sedimento. As amostras de água e sedimento foram utilizadas para a análise química de metais.

## 2.3. Coleta de peixes e amostras biológicas: sangue, brânquia e rim

As coletas de tilápia-do-nilo, *O. niloticus* ( $n = 10$  em cada lagoa, massa corpórea =  $124 \pm 34.6$  g e comprimento total =  $18 \pm 1.7$  cm) foi efetuada utilizando tarrafa nas lagoas Carapebus e Maemba e, em Alegre, foi utilizado puçá. Após a coleta, os peixes foram anestesiados em água contendo  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de benzocaína e amostra de sangue foi coletada por punção da veia caudal usando seringas heparinizadas. O sangue foi centrifugado para obter o plasma, que posteriormente seria utilizado para as análises plasmáticas (osmolalidade e concentração de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ). Posteriormente, os peixes foram mortos por secção medular e foi realizada a coleta de brânquias e rins para as análises bioquímicas (enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase,  $\text{H}^+$ -ATPase e anidrase carbônica), imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) da

superfície branquial. O plasma e amostras de brânquias e rins para as análises bioquímicas e para determinação da concentração de metais foram armazenados em nitrogênio líquido até serem transferidos para freezer -80 °C, amostras de brânquias e rins para as análises em MEV foram fixados em glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4 e para imuno-histoquímica, em solução de Bouin. As coletas foram autorizadas pelo ICMBio (SISBIO nº 77932-5) e seguiram os princípios éticos para uso de animal sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (CEUA nº 8972160123).

#### 2.4. Análise Química

Para a análise de metais, a água foi acidificada com HNO<sub>3</sub> 2%, e as amostras de sedimento, plasma, brânquias e rins, foram digeridas por 24 horas a 100 °C em 3 mL de HNO<sub>3</sub> destilado, 750 µL de HCl destilado e 250 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e filtradas em filtro de nitrocelulose de 0,45 µm. As amostras digeridas foram mantidas a 4 °C até serem analisadas. Os brancos foram constituídos apenas com os ácidos, sem a amostra biológica, seguindo o mesmo procedimento. Foram analisados 27 elementos (Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ag, Cd, Sn, Ba, La, Ce, W, Hg, Pb e Bi), em triplicata, em cada amostra, utilizando Espectrômetro de Massas de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, Agilent 7500cx, Agilent Technology USA), equipado com um amostrador automático ASX-100 (CETAC Technologies, Omaha, NE).

#### 2.5. Osmolalidade e concentração de íons no plasma

A osmolalidade foi medida em semi-microosmômetro por ponto de congelamento (Precision systems Inc, Micro-osmette Automatic High, 5004) utilizando 50 µL de amostra de plasma. A osmolalidade foi expressa em mOsm kg<sup>-1</sup>. As concentrações de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram medidas utilizando um fotômetro de chama (Digimed, Dm-61, Digimed, Brasil), e a concentração de íon Cl<sup>-</sup> foi determinada utilizando kit comercial (Labstest, Brasil) em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax M5 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA). As concentrações de íons foram expressas em mEq L<sup>-1</sup>.

## 2.6. Determinação da proteína total

O teor da proteína total nas amostras de brânquias e rins foram determinadas de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), com adaptação para leitura em microplaca (Molecular Devices SpectraMax M5) utilizando albumina bovina como padrão conforme Kruger (1994). A absorbância das amostras foi medida em  $\lambda = 595$  nm.

## 2.7. Determinação da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e H<sup>+</sup> ATPase

A atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e a H<sup>+</sup>-ATPase foram medidas nas brânquias e rins, seguindo o método de Gibbs e Somero (1989) com adaptação para leitura em microplaca descritas por Kultz e Somero (1995) e Gonzáles et al. (2005) e ambas foram expressas em  $\mu\text{mol ATP mg pt}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . O método se baseia na desfosforilação do ATP para a oxidação do NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina). Cada amostra de brânquias e de rins foram homogeneizadas em tampão SEID (sacarose 150 mM, EDTA 10Mm, imidazol 50 mM; desoxicolato de sódio 2.5 mM) e centrifugadas por 7 min a 3200 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína e a atividade das ATPases. As leituras foram feitas em um leitor de microplacas SpectraMax M5 (SpectraMax ® M5, Molecular Devices, EUA), em quadriplicata, a 340 nm com leitura em intervalos de 30 s durante 10 min. Cada poço da microplaca continha 5  $\mu\text{L}$  de amostra homogeneizada e 195  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (imidazol 30 mM, NaCl 45 mM, KCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O 3 mM, KCN 0.4 mM, ATP 1 mM, NADH 0.2 mM, pyruvate kinase 3 U/mL, LDH 2 U/mL, frutose 0.1 mM, PEP 2 mM) puro ou com ouabaína 2 mM ou com NEM 2 mM. A atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foi medida na parte sensível a ouabaína e a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase medida na fração sensível ao N-ethylmaleimide (NEM).

## 2.8. Atividade da Anidrase Carbônica (AC)

A atividade da AC, nas brânquias e rins foi medida seguindo o método de Vitale et al. (1999), que se baseia na catálise de uma solução de CO<sub>2</sub> pela enzima AC. As amostras de brânquias e rins foram homogeneizadas em tampão SEID, e centrifugados a 10,000 rpm durante 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi utilizado para

determinar a concentração de proteína e a atividade da AC. A quantificação da atividade dessa enzima é efetuada em meio de reação (manitol 225 mM, sacarose 75 mM e tris-fosfato 10 mM) pH 7,4 no qual foi adicionado 5  $\mu$ L da amostra homogeneizada e 1 mL de água destilada saturada com CO<sub>2</sub> a aproximadamente 2,5 °C. A redução do pH foi medida em intervalos de 5 s ao longo de 30 s utilizando um pHmetro (Jenway 3510, Reino Unido). A atividade enzimática foi determinada pela razão entre a declividade da reta correspondente à taxa catalisada e à taxa não catalisada (U mg pt<sup>-1</sup>)

## 2.9. Determinação da densidade e área fracional de ionócitos na superfície branquial

As amostras, previamente fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foram desidratadas em série crescente de etanol e posteriormente submersas em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (HMDS). Após secarem em temperatura ambiente, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio próprios para microscopia eletrônica de varredura (MEV) com auxílio de fita carbono dupla face. Posteriormente as amostras de brânquias foram cobertas com ouro 99% e depois analisadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Inspect S50) em aumento de 6000 x para obter imagens digitais de ionócitos em 5 áreas aleatórias no epitélio do filamento de 5 peixes por local. As imagens foram analisadas no software ImageJ (1.54d). Foram calculadas a área fracional de ionócitos (IFA =  $\Sigma$ (área de todos os ionócitos/área da imagem)) expressa em % e a densidade de ionócitos (densidade = IFA / média das áreas dos ionócitos) expressa em mm<sup>2</sup> de filamento.

## 2.10. Imunohistóquímica contra a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase nos ionócitos

As amostras fixadas em Bouin foram desidratadas em bateria crescente de etanol, diafanizadas em xilol (100%) e incluídas em parafina histológica. Foram realizados cortes longitudinais (8  $\mu$ m) em micrótomo (Micron Hm 360), as secções foram desparafinizadas em xilol (100 %) e hidratadas em bateria decrescente de etanol. Os cortes foram lavados por 10 min em tampão TBS-T com pH 7.4 (tris base diluído (1:10), triton 0,5 mM). Para bloquear sítios de ligação não específicos, as lâminas com os cortes foram pré-incubados em câmara úmida com soro normal de cabra 20% - NGS (Normal Goat Serum – Gibco Invitrogen) por 20 min, e depois foram

incubados overnight em câmara úmida a 20 °C com o primeiro anticorpo ( $\alpha 5$ , Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidade de Iowa, EUA) anti unidade  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (1:500). Posteriormente, os cortes foram lavados em TBS-T e incubados por 1 hora com o segundo anticorpo GAMPO (Goat anti-mouse peroxidase – Chemicon international, USA) diluído (1:100). Os cortes foram lavados com tampão salino Tris base diluído (1:10). Foi utilizado a coloração DAB-Ni (3.3'-diaminobenzidina com sulfato níquel amoniacal) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 min para visualizar o complexo antígeno-anticorpo nos ionócitos, a coloração foi interrompida com água destilada. As lâminas com os cortes foram analisadas em microscópio de luz (Olympus BX51, Denmark) com objetiva (40x) para capturar imagens digitais de 10 campos aleatórios nas brânquias e rins de *O. niloticus* (n = 5). A contagem de ionócitos (por mm<sup>2</sup> de epitélio) nas brânquias e área nos rins foram realizadas no software ImageJ.

## 2.11. Análise estatística

Os testes de Shapiro Wilk e Levene foram utilizados para testar a normalidade e a homogeneidade dos dados, respectivamente. As diferenças entre os pontos de coleta foram determinadas aplicando ANOVA one-way ou teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Tuckey ou Dunn, respectivamente, utilizando o software SigmaPlot (V 12.5). As relações entre as variáveis foram exploradas pela análise de componentes principais (PCA) utilizando o RStudio (V 4.3.1). As correlações entre os biomarcadores e as concentrações de metais foram avaliadas pela correlação de Spearman utilizando o software Jamovi (V 2.4.11), foram consideradas correlações acima de  $r_s > 0,7$  e  $r_s < -0,7$ . A identificação das variáveis independentes que melhor diferenciavam os locais de coleta foram determinados pela análise discriminante linear (LDA). A avaliação da correspondência entre a concentração de metais e metaloides nas amostras de água, sedimento, brânquias e rins e todos os biomarcadores foi aplicada pela análise de procrustes generalizada (GPA), que permitiu comparar o grupo de variáveis pela configuração de consenso entre elas. A LDA e a GPA foram realizadas utilizando o software Statistica 7.1 (StatSoft Inc.). Todas as análises consideraram limites de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Parâmetros físico-químicos da água e concentração de metais e metaloides na água e sedimento

Os parâmetros físico-químicos da água, assim como a concentração de metais na água e no sedimento, mensurados em todas as lagoas, estão apresentados no Capítulo 2, nas Tabela 1, 2 e 3, respectivamente.

Como já descrito, em Alegre, os níveis de oxigênio dissolvido e pH foram mais baixos que nas demais lagoas. Em Maemba (M1 e M2), o pH apresentou os maiores valores, mas não diferiu de Carapebus. Em Carapebus a condutividade e salinidade foram maiores. Em relação aos metais/metaloides, Alegre apresentou as maiores concentração de Fe, Ba, Ti e Ce na água e de Ti, Mn, Ba, Ce, La e Rb no sedimento. Carapebus apresentou as maiores concentrações de Sr e Rb na água e de Cr, As, Sr no sedimento. Maemba, no ponto 1 apresentou as menores concentrações de Mo, Rb e As na água; no sedimento apenas a concentração de Mo foi mais alta.

#### 3.2. Concentração de metais no plasma, brânquias e rins

As concentrações de metais e metaloides no plasma dos peixes estão apresentadas no Capítulo 2, na Tabela 5. Como já descrito, as maiores concentrações de metais/metaloides no plasma foram encontradas nos peixes de Maemba M1 e M2 e as menores nos peixes de Alegre.

As concentrações de metais e metaloides nas brânquias e nos rins coletados estão apresentadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Nas brânquias, as concentrações mais altas de Mn, Rb, Ba, Ce foram nos peixes de Alegre, as de Se e V nos peixes de Maemba M1 e M2, e as de Sr e Sn nos peixes de Carapebus. Nos rins, as maiores concentrações de Zn, Ba, Rb, Cr, Ni foram encontradas nos peixes de Alegre, de V, Cu, As, Se, Mo e W nos peixes de Maemba M1 e M2, e de Sn na Carapebus.

**Tabela 1.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) nas brânquias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *O. niloticus* coletados em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ ).

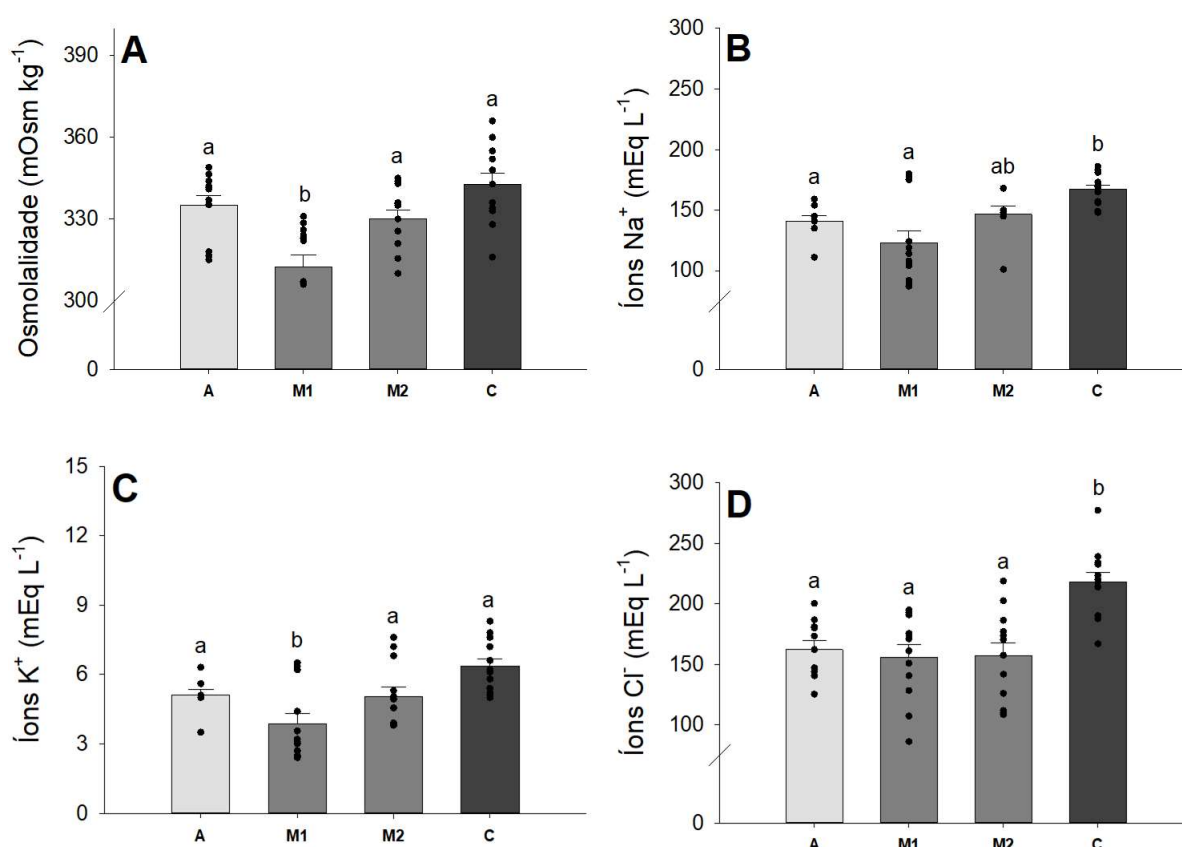
	Brânquias				LOD	LOQ
	A	M1	M2	C		
Al	182,9 (181,4 – 184,7) <sup>a</sup>	31,2 (24,5 – 53,0) <sup>b</sup>	128,3 (118,6 – 198,0) <sup>a</sup>	168,3 (58,4 – 316,8) <sup>a</sup>	0,214	0,528
Ti	3,0 (2,7 – 3,9) <sup>a</sup>	1,6 (1,6 – 2,3) <sup>b</sup>	2,4 (2,1 – 2,5) <sup>ab</sup>	2,9 (2,4 – 4,5) <sup>a</sup>	0,059	0,143
V	0,8 (0,7 – 1,1) <sup>a</sup>	4,8 (4,5 – 4,8) <sup>b</sup>	3,7 (2,6 – 4,4) <sup>bc</sup>	3,0 (2,3 – 4,2) <sup>ac</sup>	0,009	0,021
Cr	0,7 (0,6 – 1,5) <sup>a</sup>	0,3 (0,3 – 0,7) <sup>a</sup>	0,6 (0,4 – 0,8) <sup>a</sup>	0,7 (0,3 – 1,3) <sup>a</sup>	0,014	0,029
Mn	156,6 (110,7 – 179,2) <sup>a</sup>	14,1 (11,1 – 27,2) <sup>bc</sup>	12,3 (11,8 – 12,6) <sup>b</sup>	42,8 (41,8 – 43,1) <sup>ac</sup>	0,035	0,069
Fe	509,7 (442,6 – 647,6) <sup>a</sup>	558,8 (350,1 – 630,9) <sup>a</sup>	395,9 (369,4 – 580,9) <sup>a</sup>	300,7 (292,5 – 315,7) <sup>b</sup>	1,007	2,149
Ni	0,2 (0,2 – 1,6) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 – 0,2) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 – 0,2) <sup>a</sup>	0,3 (0,1 – 0,3) <sup>a</sup>	0,013	0,031
Cu	9,5 (9,0 – 13,1) <sup>a</sup>	3,2 (2,9 – 3,7) <sup>b</sup>	4,7 (3,9 – 6,9) <sup>ab</sup>	2,9 (2,8 – 3,9) <sup>b</sup>	0,073	0,166
Zn	65,6 (62,9 – 70,0) <sup>a</sup>	67,2 (63,4 – 77,1) <sup>a</sup>	79,5 (63,2 – 80,3) <sup>a</sup>	62,5 (57,0 – 76,1) <sup>a</sup>	0,795	1,613
As	LOQ	0,2 (0,1 – 0,2) <sup>b</sup>	0,1 (0,1 – 0,2) <sup>b</sup>	0,3 (0,1 – 0,4) <sup>b</sup>	0,039	0,087
Se	1,6 (1,5 – 1,9) <sup>a</sup>	34,6 (27,9 – 38,2) <sup>b</sup>	31,0 (27,1 – 32,6) <sup>b</sup>	1,7 (1,2 – 2,4) <sup>a</sup>	0,348	0,824
Rb	26,6 (24,0 – 31,6) <sup>a</sup>	8,3 (7,9 – 8,8) <sup>bc</sup>	9,5 (7,7 – 15,1) <sup>ab</sup>	4,9 (4,8 – 5,5) <sup>c</sup>	0,027	0,062
Sr	149,4 (111,6 – 228,0) <sup>a</sup>	107,9 (104,4 – 133,8) <sup>a</sup>	142,2 (140,5 – 148,4) <sup>a</sup>	432,3 (409,2 – 455,3) <sup>b</sup>	0,012	0,027
Y	0,05 (0,05 – 0,09) <sup>a</sup>	0,02 (0,01 – 0,04) <sup>b</sup>	0,03 (0,02 – 0,03) <sup>b</sup>	0,03 (0,01 – 0,06) <sup>ab</sup>	0,003	0,006
Zr	0,1 (0,1 – 0,1) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 – 0,1) <sup>a</sup>	0,2 (0,1 – 0,2) <sup>a</sup>	0,1 (0,1 – 0,2) <sup>a</sup>	0,033	0,078
Nb	0,006 (0,005 – 0,009) <sup>ab</sup>	0,004 (0,004 – 0,007) <sup>a</sup>	0,009 (0,007 – 0,01) <sup>b</sup>	0,009 (0,005 – 0,01) <sup>ab</sup>	0,002	0,0002
Mo	0,3 (0,1 – 0,3) <sup>ac</sup>	0,4 (0,3 – 0,4) <sup>ab</sup>	0,5 (0,3 – 0,6) <sup>b</sup>	0,1 (0,1 – 0,1) <sup>c</sup>	0,038	0,086
Ag	< LOQ	3,7 (3,5 – 5,7) <sup>a</sup>	1,8 (1,6 – 1,9) <sup>b</sup>	4,6 (1,3 – 8,8) <sup>ab</sup>	0,030	0,076
Cd	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,016	0,039
Sn	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,2 (0,2 – 0,3)	0,011	0,025
Ba	55,6 (52,7 – 58,5) <sup>a</sup>	6,1 (5,1 – 14,5) <sup>b</sup>	7,4 (6,4 – 9,6) <sup>b</sup>	4,5 (2,8 – 10,5) <sup>b</sup>	0,019	0,045
La	0,1 (0,1 – 0,2) <sup>a</sup>	0,01 (0,01 – 0,04) <sup>b</sup>	0,05 (0,04 – 0,1) <sup>bc</sup>	0,1 (0,03 – 0,1) <sup>ac</sup>	0,003	0,006
Ce	0,5 (0,4 – 0,8) <sup>a</sup>	0,02 (0,02 – 0,1) <sup>b</sup>	0,1 (0,1 – 0,1) <sup>b</sup>	0,2 (0,1 – 0,4) <sup>a</sup>	0,004	0,009
W	0,05 (0,04 – 0,06) <sup>a</sup>	0,06 (0,04 – 0,07) <sup>a</sup>	0,05 (0,04 – 0,08) <sup>a</sup>	0,03 (0,01 – 0,02) <sup>b</sup>	0,009	0,023
Hg	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOQ	0,048	0,091
Pb	0,5 (0,5 – 0,6) <sup>a</sup>	0,5 (0,5 – 1,2) <sup>a</sup>	0,4 (0,4 – 0,7) <sup>a</sup>	0,2 (0,1 – 0,6) <sup>a</sup>	0,038	0,082
Bi	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	0,085	0,212

**Tabela 2.** Concentração de metais e metaloides (mediana e valores do 1º e 3º quartil) nos rins ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *O. niloticus* coletados em Alegre (A) e nas lagoas Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação. Letras diferentes indicam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ ).

	Rins				LOD	LOQ
	A	M1	M2	C		
<b>Al</b>	434,0 (147,5 – 567,6) <sup>a</sup>	17,0 (8,8 – 22,6) <sup>b</sup>	114,6 (40,5 – 189,5) <sup>a</sup>	119,4 (82,2 – 837,1) <sup>a</sup>	0,214	0,528
<b>Ti</b>	2,4 (0,2 – 4,2) <sup>a</sup>	0,8 (0,4 – 0,9) <sup>a</sup>	0,5 (0,1 – 0,6) <sup>a</sup>	2,8 (1,5 – 15,9) <sup>a</sup>	0,059	0,143
<b>V</b>	1,9 (1,4 – 2,1) <sup>a</sup>	5,2 (4,7 – 7,9) <sup>b</sup>	5,8 (3,1 – 6,2) <sup>b</sup>	1,4 (0,6 – 3,8) <sup>a</sup>	0,009	0,021
<b>Cr</b>	6,7 (6,2 – 7,0) <sup>a</sup>	< LOQ	1,9 (1,0 – 2,7) <sup>b</sup>	1,1 (0,7 – 1,6) <sup>b</sup>	0,014	0,029
<b>Mn</b>	16,5 (5,0 – 71,3) <sup>a</sup>	4,0 (3,0 -4,4) <sup>b</sup>	3,5 (2,2 – 7,0) <sup>b</sup>	12,3 (2,4 – 31,4) <sup>ab</sup>	0,035	0,069
<b>Fe<sup>56</sup></b>	807,2 (787,7 – 857,4) <sup>ac</sup>	403,7 (367 – 647,1) <sup>b</sup>	1192,8 (1161,0 – 1223,0) <sup>a</sup>	606,3 (569,4 – 634,0) <sup>bc</sup>	1,007	2,149
<b>Ni</b>	5,4 (2,1 – 9,3) <sup>a</sup>	0,3 (0,2 – 0,5) <sup>b</sup>	0,4 (0,3 – 0,4) <sup>b</sup>	0,4 (0,1 – 1,1) <sup>b</sup>	0,013	0,031
<b>Cu</b>	49,4 (45,7 – 86,2) <sup>ac</sup>	124,1 (115,8 – 131,6) <sup>b</sup>	110,5 (57,6 – 273,4) <sup>bc</sup>	17,5 (14,6 – 34,5) <sup>a</sup>	0,073	0,166
<b>Zn</b>	147,2 (142,0 – 152,4) <sup>a</sup>	86,5 (68,2 – 96,6) <sup>b</sup>	71,9 (71,8 – 72,9) <sup>b</sup>	76,5 (75,3 – 80,0) <sup>b</sup>	0,795	1,613
<b>As</b>	< LOQ	0,6 (0,6 – 0,9) <sup>a</sup>	0,7 (0,5 – 0,8) <sup>a</sup>	< LOQ	0,039	0,087
<b>Se</b>	< LOQ	110,8 (75,2 – 125,5) <sup>a</sup>	104,7 (71,2 -109,6) <sup>a</sup>	6,3 (4,9 – 6,6) <sup>b</sup>	0,348	0,824
<b>Rb</b>	26,0 (20,6 – 43,4) <sup>a</sup>	14,2 (10,1 – 17,0) <sup>b</sup>	14,1 (7,7 – 18,4) <sup>b</sup>	8,5 (7,5 – 12,4) <sup>b</sup>	0,027	0,062
<b>Sr</b>	4,7 (1,5 – 6,63) <sup>ab</sup>	1,6 (1,6 – 2,1) <sup>a</sup>	4,5 (2,5 – 5,9) <sup>ab</sup>	7,9 (7,2 – 8,5) <sup>b</sup>	0,012	0,027
<b>Y</b>	0,1 (0,03 – 0,4) <sup>a</sup>	0,005 (0,0022 – 0,01) <sup>b</sup>	0,01 (0,0023 – 0,02) <sup>ab</sup>	0,1 (0,02 – 0,2) <sup>a</sup>	0,002	0,0021
<b>Zr</b>	< LOQ	0,04 (0,02 – 0,1) <sup>ab</sup>	0,02 (0,01- 0,1) <sup>a</sup>	0,2 (0,1 – 0,3) <sup>b</sup>	0,038	0,086
<b>Nb</b>	< LOQ	< LOQ	0,04 (0,03 – 0,05) <sup>a</sup>	0,04 (0,03 – 0,06) <sup>a</sup>	0,0002	0,002
<b>Mo</b>	1,5 (1,3 – 1,8) <sup>a</sup>	3,6 (3,1 – 5,6) <sup>b</sup>	4,4 (1,8 – 19,6) <sup>b</sup>	1,7 (1,3 – 1,8) <sup>a</sup>	0,038	0,086
<b>Ag</b>	< LOQ	13,7 (5,1 – 26,7) <sup>a</sup>	18,0 (0,6 – 40,7) <sup>a</sup>	29,6 (12,4 – 114,0) <sup>a</sup>	0,030	0,076
<b>Cd</b>	0,54 (0,51 – 1,88) <sup>a</sup>	1,2 (1,0 – 1,4) <sup>a</sup>	2,03 (1,03 -2,08) <sup>a</sup>	0,2 (0,2 – 0,3) <sup>b</sup>	0,016	0,039
<b>Sn</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,5 (1,4 – 4,1)	0,011	0,025
<b>Ba</b>	31,6 (29,7 – 33,7) <sup>a</sup>	6,4 (5,4 – 8,6) <sup>b</sup>	6,5 (4,7 – 7,3) <sup>b</sup>	6,8 (1,4 – 8,1) <sup>b</sup>	0,019	0,045
<b>La</b>	0,8 (0,5 – 1,5) <sup>a</sup>	0,01 (0,01 – 0,04) <sup>b</sup>	0,08 (0,01 -0,1) <sup>bc</sup>	0,3 (0,05 – 0,6) <sup>ac</sup>	0,003	0,006
<b>Ce</b>	2,2 (1,1 – 5,6) <sup>a</sup>	0,01 (0,01 – 0,1) <sup>b</sup>	0,1 (0,02 – 0,3) <sup>bc</sup>	0,7 (0,1 – 1,4) <sup>ac</sup>	0,004	0,009
<b>W</b>	< LOQ	0,1 (0,05 – 0,1) <sup>a</sup>	0,1 (0,06 – 0,1) <sup>a</sup>	< LOQ	0,009	0,023
<b>Hg</b>	< LOQ	0,2 (0,2 – 0,2) <sup>a</sup>	0,3 (0,2 – 0,4) <sup>ab</sup>	0,6 (0,4 – 0,8) <sup>b</sup>	0,048	0,091
<b>Pb</b>	2,0 (1,2 – 4,4) <sup>ab</sup>	1,5 (1,4 – 2,1) <sup>a</sup>	3,9 (2,1 – 4,8) <sup>b</sup>	< LOQ	0,038	0,082
<b>Bi</b>	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD	0,085	0,212

### 3.3. Osmolalidade e concentração de íons no plasma

A osmolalidade plasmática dos peixes da lagoa Maemba (M1) foram menor que a osmolalidade plasmática dos peixes dos demais locais, inclusive dos coletados em M2, na mesma lagoa (Figura 1A). A concentração de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foram mais altas no plasma dos peixes da Carapebus (Figura 1 B e D, respectivamente) e a concentração  $\text{K}^+$  foi menor no plasma dos peixes de Maemba M1 (Figura 1 C).

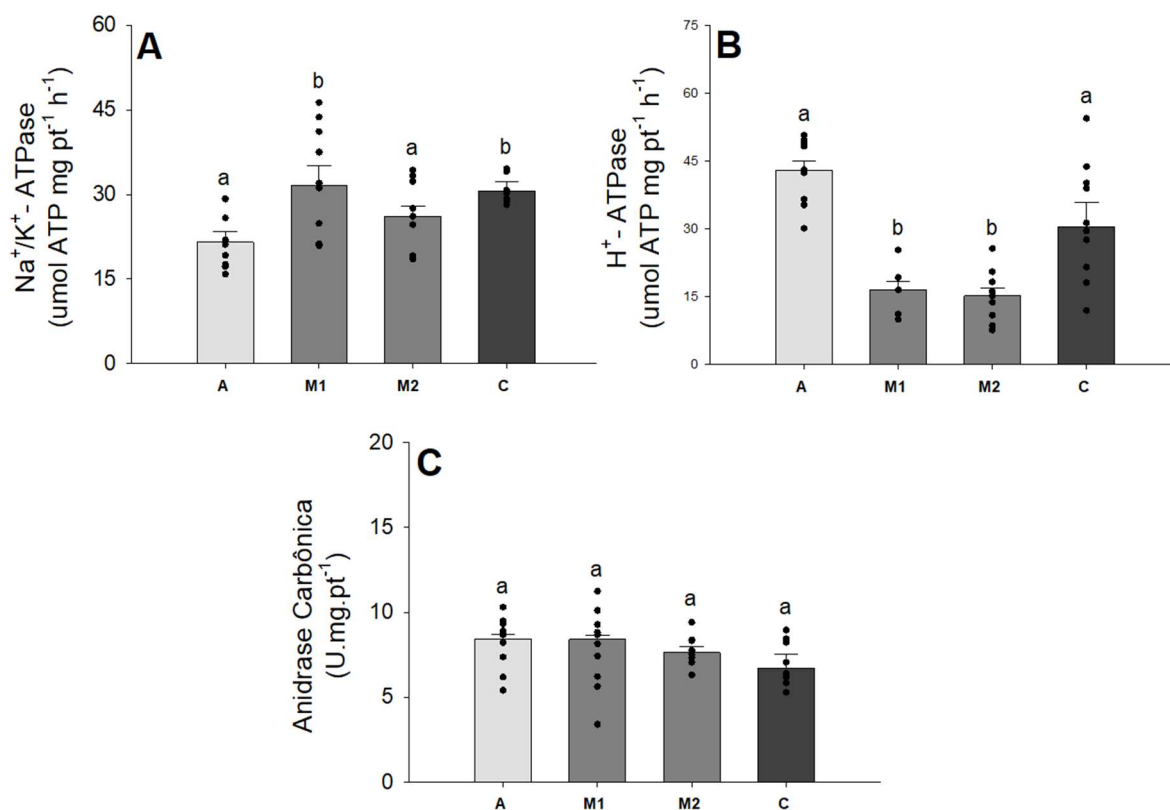


**Figura 1.** A: Osmolalidade plasmática de *Oreochromis niloticus*, Concentração de íons no plasma de *Oreochromis niloticus*. B: íons  $\text{Na}^+$ ; C: íons  $\text{K}^+$ ; D: íons  $\text{Cl}^-$ , coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e Carapebus (C). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). Diferentes letras significam diferença significativa entre Alegre e as lagoas ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Atividade das ATPases e anidrase carbônica nas brânquias

A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi maior nas brânquias dos peixes coletados no ponto 1 da Maemba e Carapebus, quando comparados com Alegre e o ponto 2 de Maemba (Figura 2A). A atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase nas brânquias foram menores na

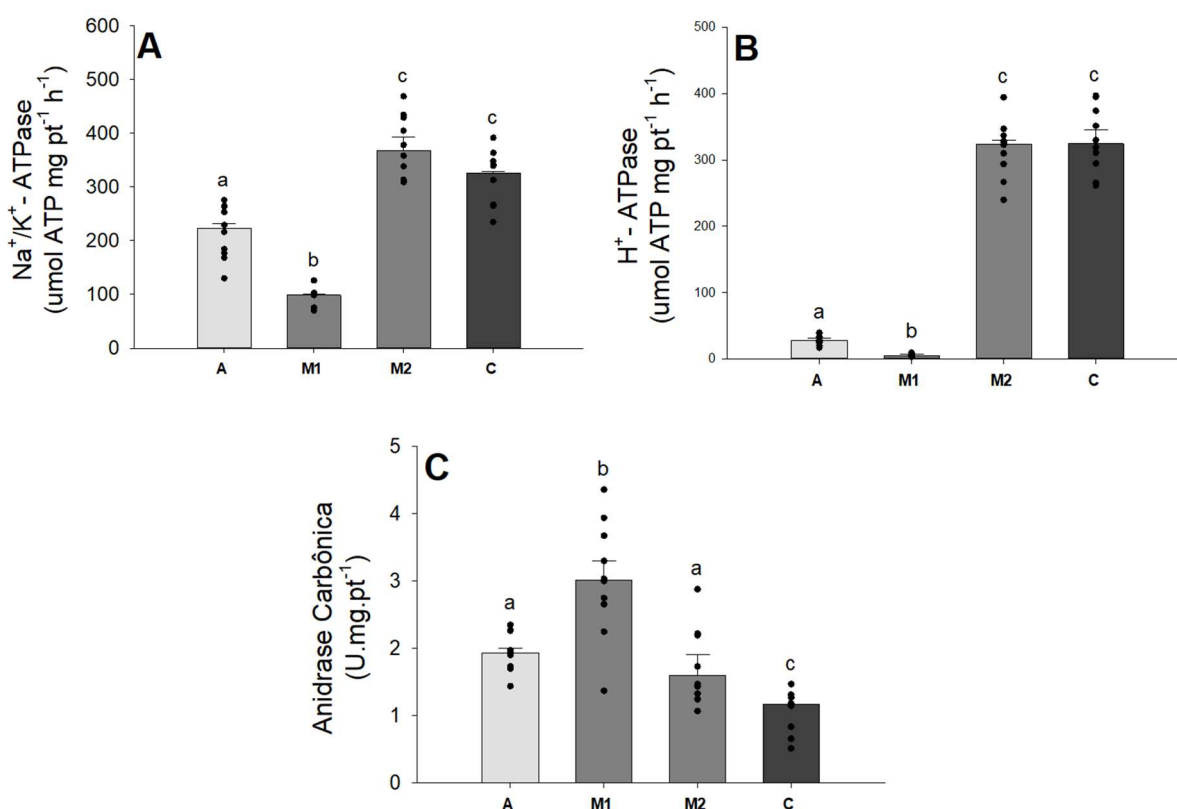
lagoa Maemba M1 e M2 (Figura 2B) e a atividade da anidrase carbônica não diferiu entre as brânquias dos peixes dos diferentes locais de coleta (Figura 2C).



**Figura 2.** Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (A) e H<sup>+</sup>-ATPase (B) e anidrase carbônica (C) nas brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n=10). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas (p < 0.05).

### 3.5. Atividade das ATPases e anidrase carbônica nos rins

A atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e H<sup>+</sup>-ATPase foi mais alta nos rins dos peixes coletados no ponto 2 da Maemba e na Carapebus, e a mais baixa foi nos rins dos peixes coletados no ponto 1 da lagoa Maemba (Figura 3A, 3B). Entretanto, a atividade da anidrase carbônica foi maior nos rins dos peixes coletados no ponto 1 da Maemba, enquanto a menor atividade foi nos rins dos peixes da Carapebus (Figura 3C).

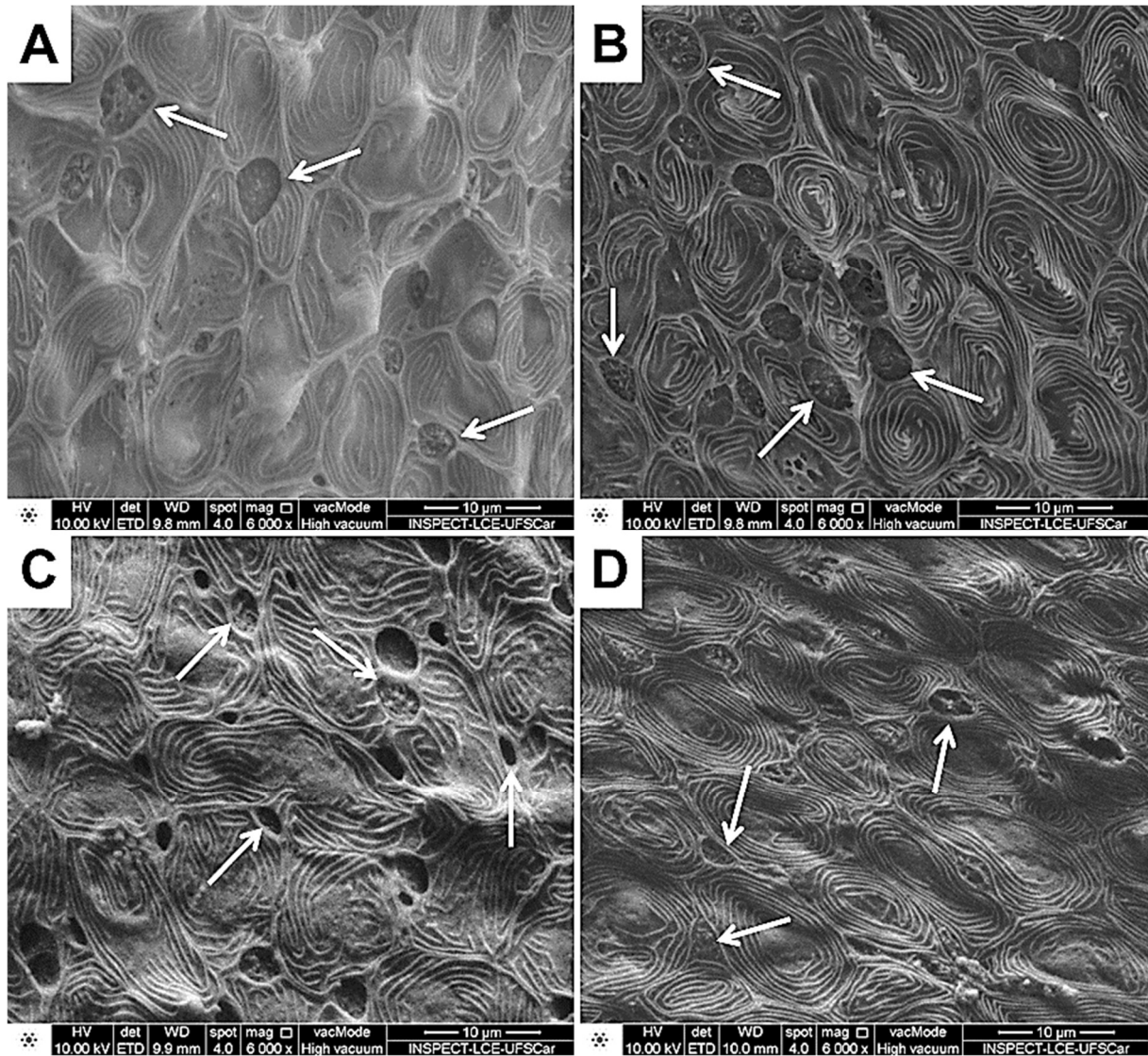


**Figura. 3.** Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (A), H<sup>+</sup>-ATPase (B) e anidrase carbônica (C) nos rins de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média ± SEM (n=10). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas (p < 0.05).

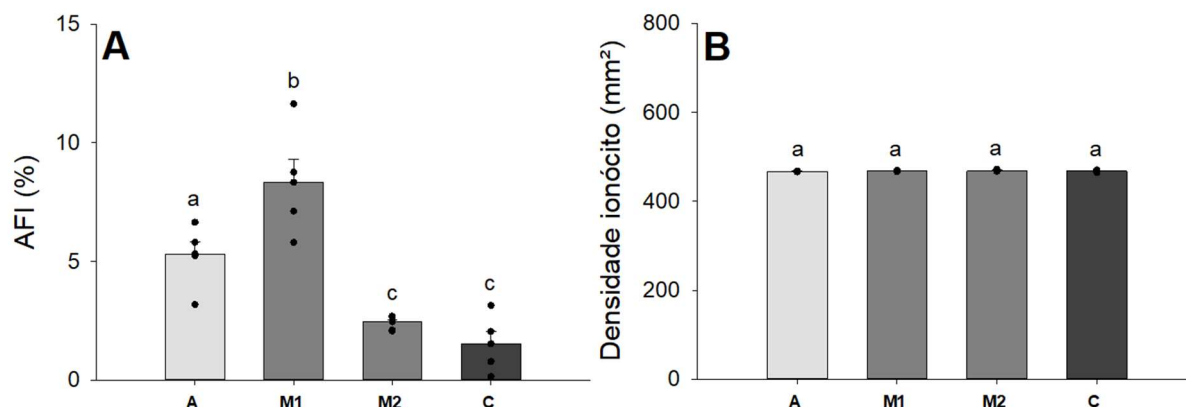
### 3.6. Densidade e área fracional de ionócitos (IFA) na superfície branquial

Os ionócitos tem como característica, superfície côncava e a presença de projeções de microvilosidades na superfície apical, diferindo das células pavimentosas, que por sua vez, possuem superfície convexa e a presença de microdobras na superfície apical. A superfície apical dos ionócitos no epitélio do filamento das brânquias de *O. niloticus* podem ser observadas na Figura 4.

A área fracional de ionócitos foi maior no epitélio dos filamentos das brânquias dos peixes coletados no ponto 1 da Maemba e a menor área fracional de ionócitos nos peixes do ponto 2 da Maemba e da Carapebus (Figura 5A). Entretanto, não foi observada diferença entre a densidade de ionócitos nos filamentos das brânquias dos peixes nos diferentes locais de coleta (Figura 5B).



**Figura. 4.** Electronmicrografias de varredura da superfície epitelial do filamento das brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em (A) Alegre, (B) Maemba ponto1, (C) Maemba ponto2 e (D) Carapebus. Setas brancas indicam a superfície apical dos ionócitos. Barra de escala = 10 µm



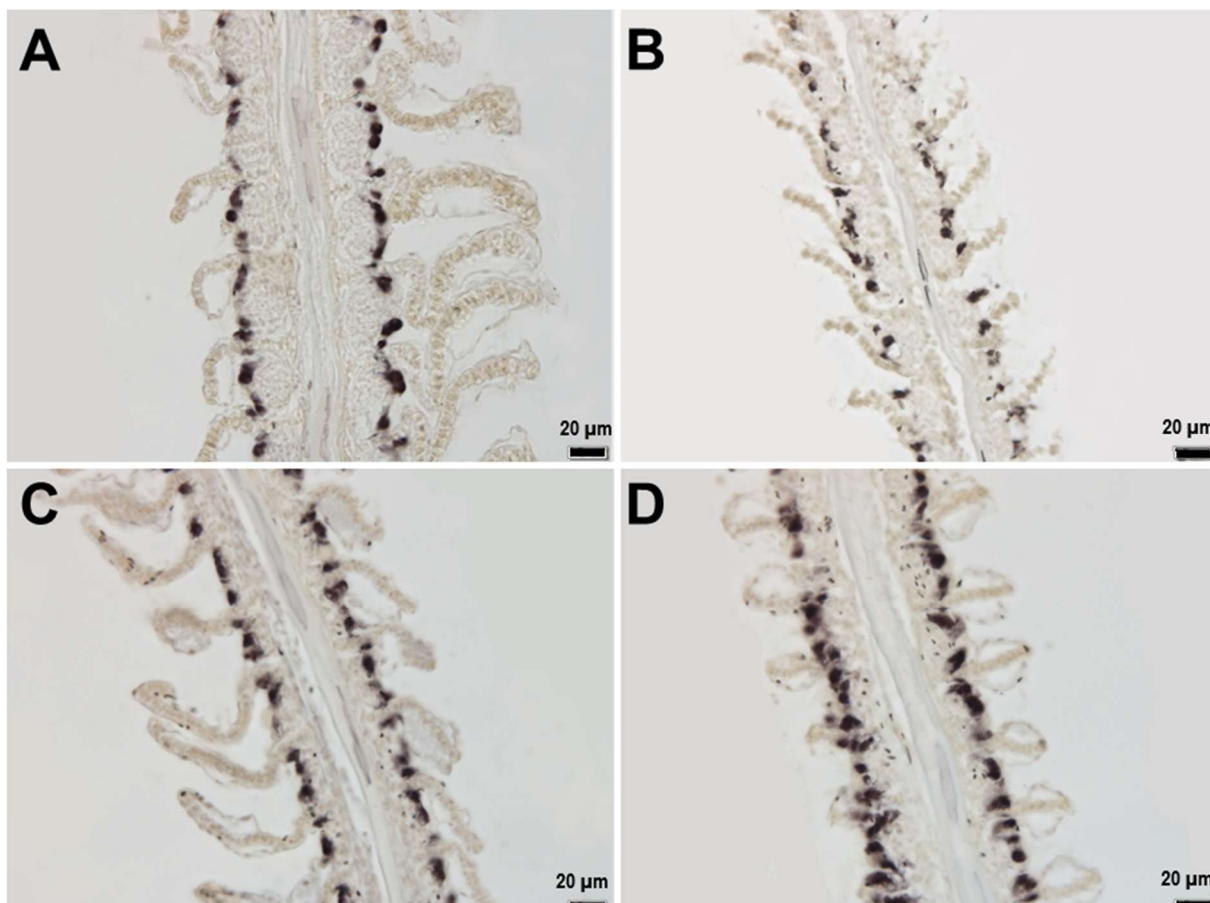
**Figura. 5.** A: Área fracional de ionócitos (AFI) na superfície epitelial do filamento das brânquias de *Oreochromis niloticus* e B: Densidade de ionócitos no filamento branquial, coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM (n=5, análise de 25 campos aleatórios). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas ( $p < 0.05$ ).

### 3.7. Imunohistoquímica de ionócitos

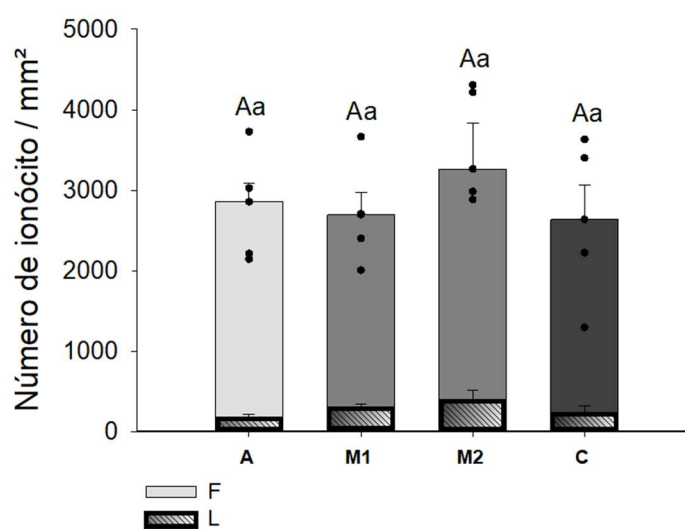
A localização imunohistoquímica das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nos ionócitos nas brânquias e nos rins podem ser observadas nas Figuras 6 e 8, respectivamente.

Não foram observadas diferenças nos números de ionócitos, tanto nos filamentos quanto nas lamelas, das brânquias dos peixes coletados em cada local (Figura 7).

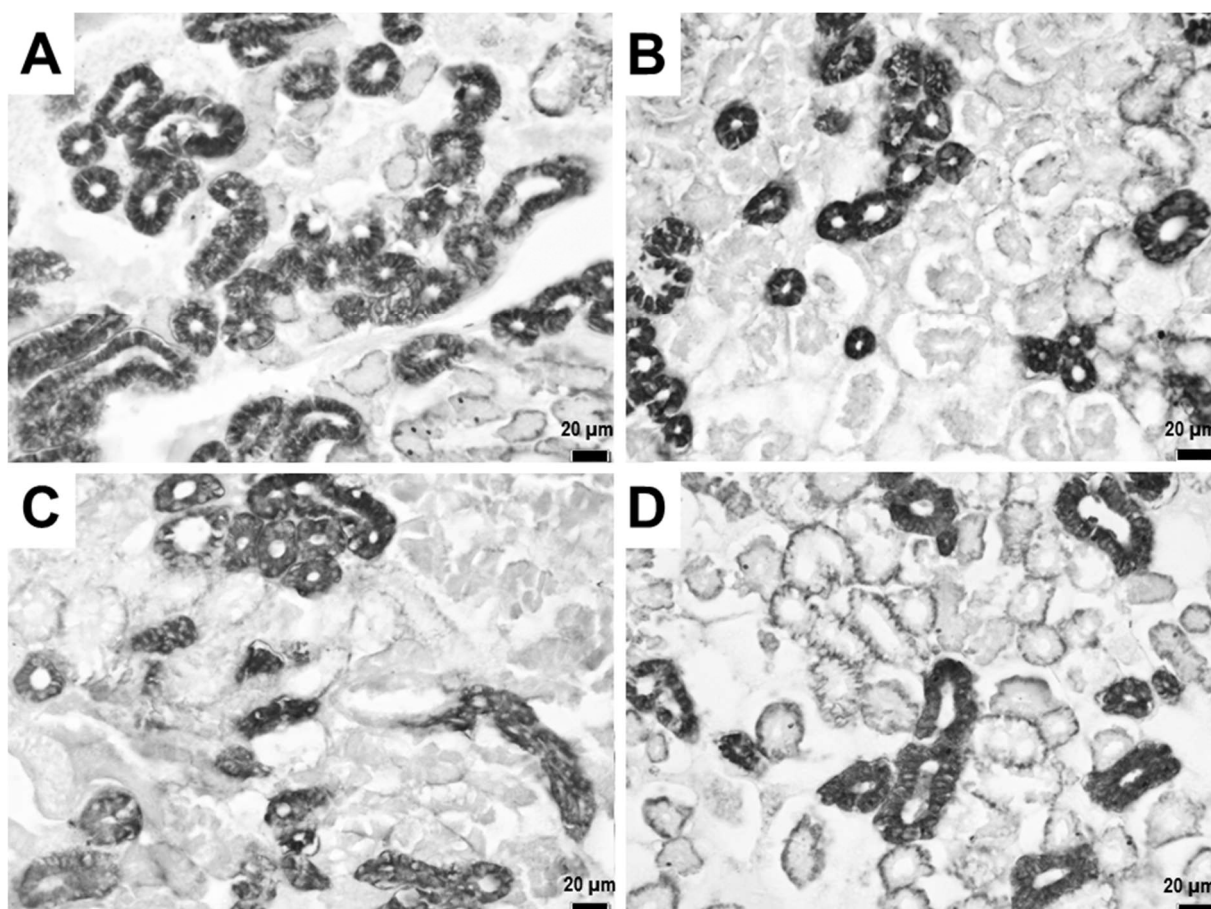
Entretanto, a área de ionócitos nos túbulos renais foi maior em Alegre do que nos rins dos peixes coletados em Maemba M1 e M2, e Carapebus (Figura 9).



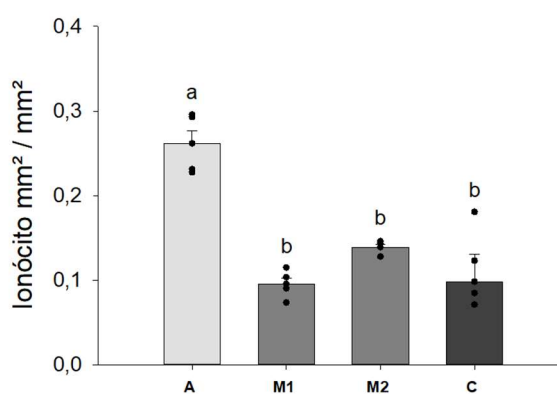
**Figura 6.** Localização imunohistoquímica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$  nos ionócitos (preto) nos filamentos e lamelas da brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em (A) Alegre, (B) Maemba ponto1, (C) Maemba ponto2 e (D) Carapebus. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7.** Ionócitos nos filamentos (F) e nas lamelas (L) das brânquias de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM ( $n=5$ , análise de 10 campos aleatórios). Diferentes letras, maiúsculas para filamento e minúsculas para lamela, indicam diferença significativa entre as lagoas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Localização imunohistoquímica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nos ionócitos (preto) nos rins de *Oreochromis niloticus* coletados em (A) Alegre, (B) Maemba ponto1, (C) Maemba ponto2 e (D) Carapebus. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .



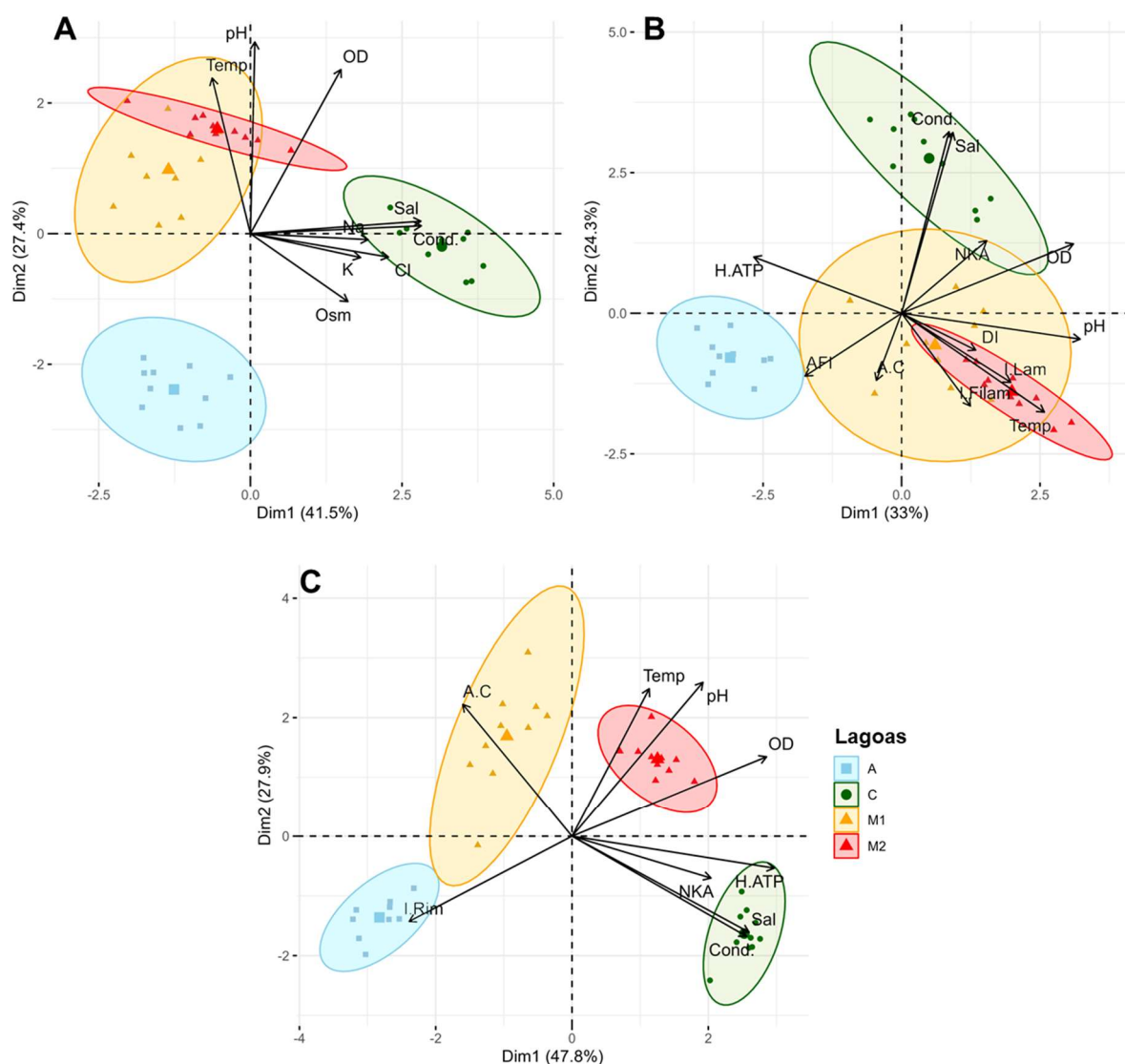
**Figura 9.** Área de ionócitos pela área de epitélio dos túbulos renais de *Oreochromis niloticus* coletados em Alegre (A), na lagoa Maemba ponto 1 (M1) e ponto 2 (M2) e na lagoa Carapebus (C). Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM (n=5, análise de 10 campos aleatórios). Diferentes letras indicam diferença significativa entre as lagoas ( $p < 0,05$ ).

### 3.8. Análise de componentes principais (PCA)

#### 3.8.1 PCA - Parâmetros físico-químicos da água e os biomarcadores

A PCA entre as variáveis dos parâmetros físico-químicos da água e os biomarcadores no plasma representou 68,9% (PC1 = 41,5% e PC2 = 27,4), nas brânquias: 57,3% (PC1 = 33% e PC2 = 24,3%) e nos rins: 75,7% (PC1 = 47,8% e PC2 = 27,9%), respectivamente, da variação total nos dois componentes principais de cada análise (Figura 10).

A concentração de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foram agrupados aos parâmetros físico-químicos de salinidade e condutividade na Carapebus (Figura 10A). A  $\text{H}^+$ -ATPase nas brânquias dos peixes coletados em Maemba M1 teve relação inversa com o pH, e a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias dos peixes de Carapebus teve relação inversa com a área fracional de ionócito (Figura 10B). A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a  $\text{H}^+$ -ATPase nos rins foi agrupada com a salinidade e condutividade na Carapebus (Figura 10C).



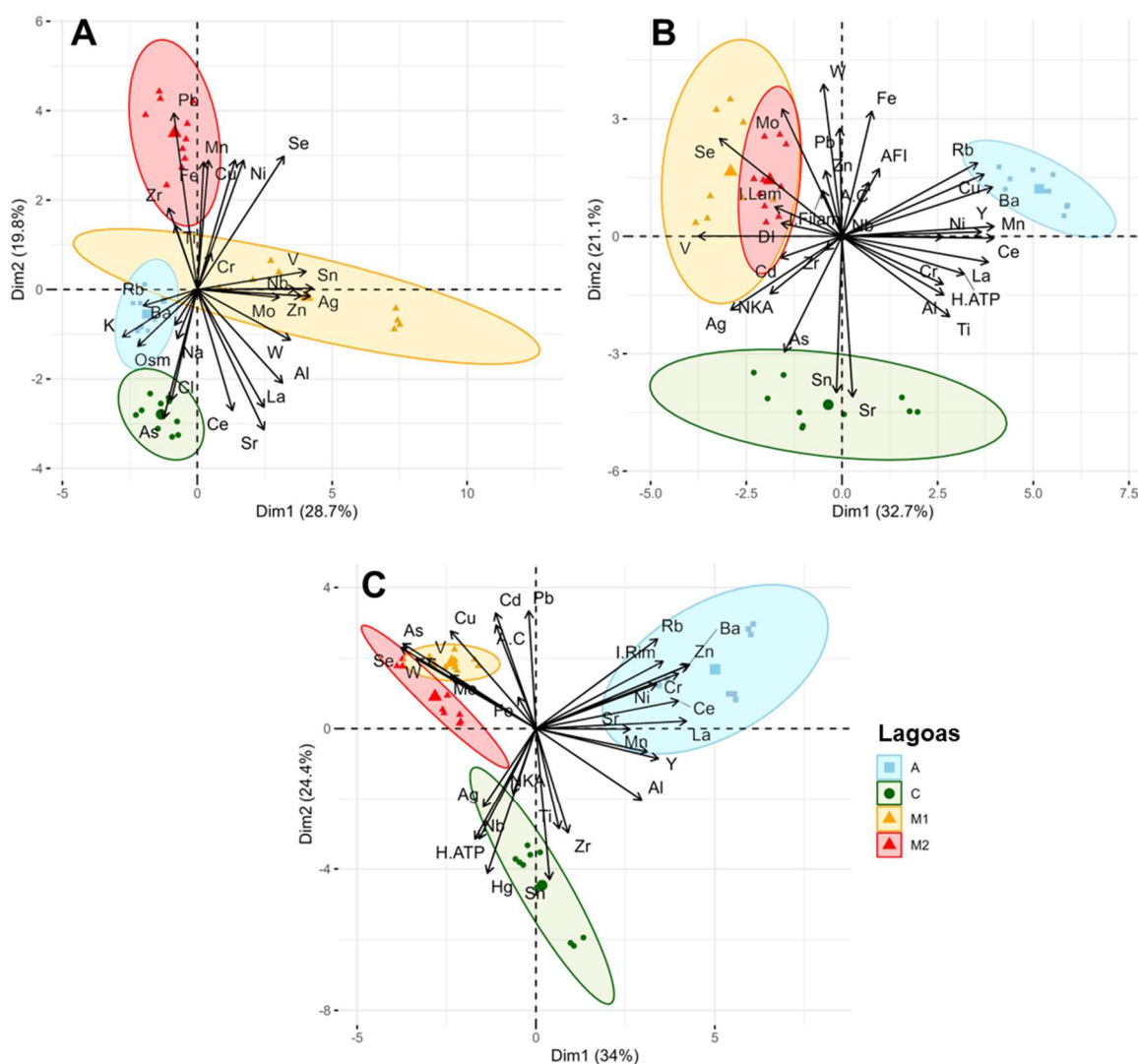
**Figura 10.** Análise de componentes principais entre os parâmetros físicos e químicos da água e os biomarcadores no plasma (A) nas brânquias (B) e nos rins (C). Cond: condutividade ( $\text{mS cm}^{-1}$ ); Sal: salinidade ( $\%$ ); OD: oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ); Temp: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); Osm: osmolalidade; Na: íons  $\text{Na}^+$ ; K: íons  $\text{K}^+$ ; Cl: íons  $\text{Cl}^-$ ; I. Film: número de ionócito no filamento; I. Lam: número de ionócito na lamela; DI: densidade de ionócito; AFI: área fracional de ionócitos; NKA:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase; H.ATP:  $\text{H}^+$  - ATPase; A.C: anidrase carbônica; I. Rins: área de ionócitos por área dos túbulos renais. As lagoas A - Alegre, C - Carapebus, M1 - Maemba ponto 1, M2 - Maemba ponto 2.

### 3.8.2 PCA – Metais no plasma, nas brânquias e nos rins e os biomarcadores

A PCA entre as variáveis dos metais no plasma, nas brânquias e nos rins, e os respectivos biomarcadores resumiram 48,5% ( $\text{PC1} = 28,7\%$  e  $\text{PC2} = 19,8\%$ ), 53,8%

(PC1 = 32,7% e PC2 = 21,1) e 58,4% (PC1 = 34% e PC2 = 24,4), respectivamente, da variação total nos dois componentes principais de cada análise (Figura 11).

Os íons  $\text{Cl}^-$  foram agrupados com o As no plasma dos peixes de Carapebus, entretanto o restante dos metais no plasma não foi agrupado com nenhum biomarcador no plasma (Figura 11A). Nas brânquias, a  $\text{H}^+$ -ATPase foi agrupada com o La, Cr, Al e Ti, mas não foram associados a nenhuma lagoa, e a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi agrupada com Ag, mas também não foi associada a nenhuma lagoa (Figura 11B). Nos rins, a  $\text{H}^+$ -ATPase foi agrupada com Ag, Nb e Hg nos peixes coletados em Carapebus e a área dos ionócitos por área do epitélio dos túbulos renais foi agrupada aos metais Rb, Ba, Zn, Cr e Ni nos rins dos peixes coletados em Alegre (Figura 11C).



**Figura 11.** Análise de componentes principais entre os metais e os biomarcadores no plasma (A) nas brânquias (B) e nos rins (C). Osm: osmolalidade; Na: íons Na<sup>+</sup>; K: íons K<sup>+</sup>; Cl: íons Cl<sup>-</sup>; I. Film: número de ionócito no filamento; I. Lam: número de ionócito na lamela; DI: densidade de ionócito; AFI: área fracional de ionócitos; NKA: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase; H.ATP: H<sup>+</sup> - ATPase; A.C: anidrase carbônica; I. Rim: área de ionócitos por área de epitélio renal. As lagoas A- Alegre, C – Carapebus, M1 – Maemba ponto 1, M2 – Maemba ponto 2.

### 3.9. Análise de correlação de Spearman ( $r_s < -0.70$ e $r_s > 0.70$ )

A análise de correlação de Spearman possibilitou correlacionar as variáveis e determinar a força de interação pelo fator de correlação. Foi observado correlação entre os biomarcadores e os parâmetros físico-químicos da água, sendo apontado correlação entre pH e H<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias ( $r_s = -0,78$ ) e a salinidade com a área de ionócito nos rins ( $r_s = -0,70$ ). A análise entre os metais e biomarcadores nas brânquias apontou correlação entre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase com os metais V ( $r_s = -0,72$ ) e Mn ( $r_s = 0,76$ ) e, nos rins, apontou correlação entre a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e da H<sup>+</sup>-ATPase com Nb ( $r_s = 0,71$  e  $r_s = 0,74$ , respectivamente). Entretanto, nenhuma correlação foi apontada entre os metais no plasma e a osmolalidade ou a concentração de íons plasmáticos.

Correlação entre os parâmetros físico-químicos e a concentração de metais, tanto na água quanto no sedimento. Sendo que na água foi observado correlação entre o pH com Mo ( $r_s = 0,74$ ), condutividade e salinidade com Ba ( $r_s = -0,81$  e  $r_s = -0,82$ , respectivamente), e no sedimento foi observado correlação entre condutividade e salinidade com Nb ( $r_s = 0,7$  e  $r_s = 0,71$ , respectivamente), Ag ( $r_s = 0,78$  e  $r_s = 0,79$  respectivamente) e W ( $r_s = 0,77$  e  $r_s = 0,78$ , respectivamente).

### 3.10. Análise discriminante linear (LDA)

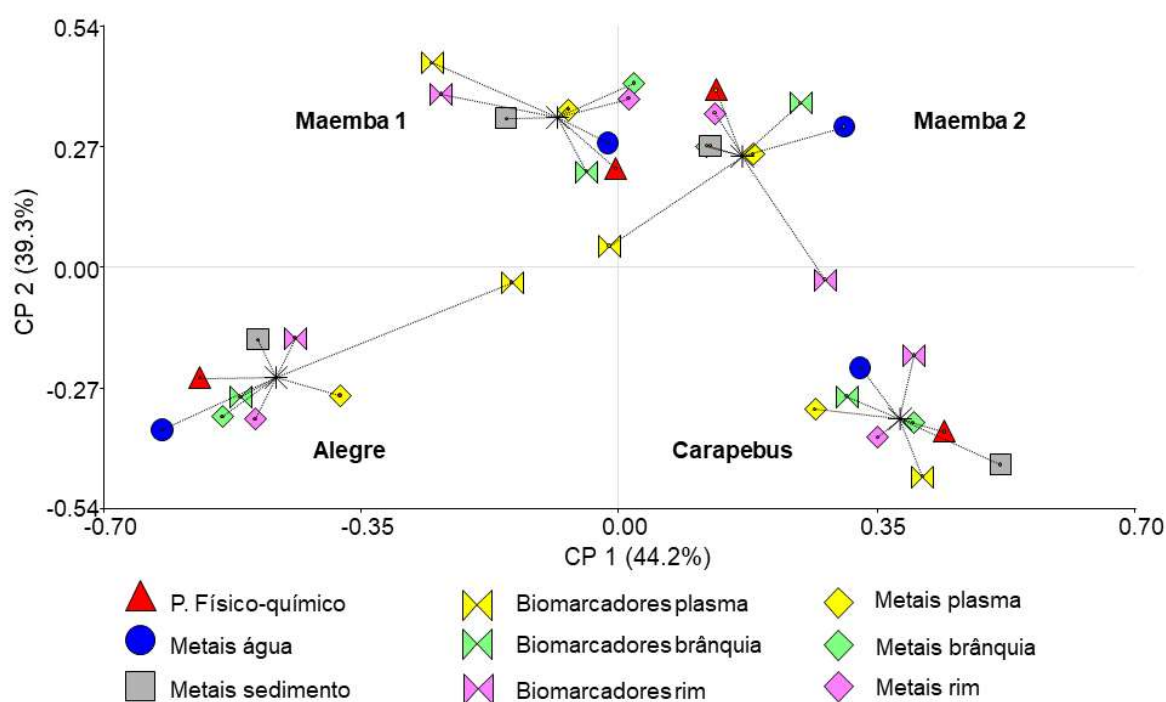
A LDA foi utilizada para identificar quais biomarcadores foram determinantes para explicar as diferenças espaciais. Neste trabalho foram utilizados 12 biomarcadores no total. A LDA apontou que entre os 12 biomarcadores, 9 diferenciam os pontos de coleta (H<sup>+</sup>-ATPase nos rins e nas brânquias, a área de ionócitos nos rins, a NKA e a anidrase carbônica nos rins, a NKA e o número de ionócitos nas lamelas das brânquias, a osmolalidade plasmática e a anidrase carbônica nas

brânquias). Para uma classificação 100% correta foram necessários 10 desses biomarcadores.

### 3.11. Análise de procrustes generalizada (GPA)

A GPA foi utilizada para avaliar a correspondência entre os parâmetros físico-químicos da água, as concentrações de metal na água, sedimento, plasma, brânquias e rins de *O. niloticus* coletados nas lagoas e em Alegre, e os biomarcadores utilizados no plasma, nas brânquias e nos rins. A soma dos eixos da GPA explicou 83,5% da variância total, sendo o primeiro eixo = 44,2% e o segundo eixo = 39,3% (Figura 12). A configuração de consenso dos grupos formados pelos conjuntos de dados separou os locais de coleta. Entretanto, apesar do consenso dos grupos de Alegre estarem mais distantes dos consensos das lagoas, o eixo 1 (CP1) separou Alegre e Maemba ponto 1 de Carapebus e Maemba ponto 2.

Os grupos de dados mais afastados do consenso dos pontos de coleta foram os biomarcadores no plasma em Alegre e Maemba ponto 2, e os biomarcadores nos rins em Maemba ponto 2. No entanto, os grupos de dados que apresentam fortes correspondências são os biomarcadores nas brânquias e metais nas brânquias em Alegre, e biomarcadores nas brânquias e metais na água em Maemba ponto 1 e 2 e Carapebus.



**Figura 12.** Biplot de GPA considerando os parâmetros físico-químicos, as concentrações de metais na água e no sedimento, no plasma, nas brânquias e nos rins, e os biomarcadores medidos no plasma, nas brânquias e nos rins de *O. niloticus*, coletados em Alegre, Maemba ponto 1 e 2, e Carapebus.

#### 4. Discussão

Os parâmetros físico-químicos da água, incluindo o oxigênio dissolvido (OD), o pH e a salinidade, podem influenciar na mobilidade dos metais, sendo, a variação de pH, uma das variáveis mais importantes nesse processo (USEPA, 2007). Em condições alcalinas, como observado na lagoa Maemba (M1 e M2), os metais tendem a precipitar como óxidos e hidróxidos, diminuindo sua biodisponibilidade, exceto pela formação de hidróxidos de metais alcalinos (exemplo:  $Al^{3+}$  e  $Ba^{2+}$ ), e consequentemente diminuindo sua toxicidade (Cornelis e Nordberg, 2007). Entretanto, para alguns metais como Pb, ambientes alcalinos podem aumentar seu efeito tóxico (Grosell et al. 1993, Grosell et al. 2006) ou não influenciar, como ocorre com o Cd (Niyogi et al. 2008). Apesar do comportamento dos metais em ambiente alcalino ter a tendência a precipitar no sedimento, os íons metálicos estão mais biodisponíveis, pois a competição entre os íons metálicos e o íons  $H^+$  é menor (Grosell et al. 2006 ; Niyogi et al. 2008 ) isso explicaria o porquê da Maemba apresentar menos metais com concentrações altas na água do que as demais lagoas e ainda assim

apresentar concentrações de metais acumuladas no plasma, nas brânquias e nos rins semelhantes as concentrações acumuladas nos tecidos dos peixes dos demais locais.

A osmolalidade plasmática dos peixes teleósteos geralmente varia entre 260 a 380 mOsm kg<sup>-1</sup> (Evans e Claiborne, 2009). Embora os peixes do ponto 1 da Maemba tenham exibido a osmolalidade menor que o plasma dos peixes de Carapebus e Alegre, todos permaneceram dentro do intervalo de 310 a 350 mOsm kg<sup>-1</sup>. Isso sugere que os peixes foram capazes de manter o equilíbrio osmótico mesmo em condições diferentes. A maior concentração de íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> no plasma dos peixes da Carapebus pode estar associada a maior disponibilidade desses íons na lagoa, devido suas características salobras.

A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase é a principal enzima responsável pelos mecanismos de transporte de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Em ambientes com alterações de salinidade, como ocorre na lagoa Carapebus, a NKA pode ser afetada (Lee et al., 2000). Alguns estudos como os de Kammerer et al., (2009) em *Oreochromis mossambicus*, Yan et al., (2018) em *Schizothorax prenanti*, e Mohamed et al., (2021) em *O. niloticus*, mostraram aumento da atividade da NKA pela exposição a diferentes salinidades, isso corrobora com os resultados observados neste estudo, pois a maior atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias foi observada nos peixes de Carapebus.

A atividade da anidrase carbônica está relacionada com a hidratação do CO<sub>2</sub> gerando HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup> (Hwang e Lee, 2007). A H<sup>+</sup>-ATPase atua na regulação do pH intracelular, bombeando os íons de H<sup>+</sup> para fora da célula e participa indiretamente da absorção de Na<sup>+</sup>. A cada H<sup>+</sup> eliminado, um Na<sup>+</sup> entra no organismo para a manutenção do eletroneutralidade do sistema biológico. Foi observado neste estudo que a atividade da anidrase carbônica não diferiu entre os peixes das lagoas, entretanto, a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi menor nas brânquias dos peixes de Maemba (ponto 1 e 2) quando comparado aos de Alegre e Carapebus. A eliminação dos íons H<sup>+</sup> resultantes da hidratação do CO<sub>2</sub> pela anidrase carbônica nas brânquias dos peixes de Maemba podem estar sendo eliminados pelo trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e isso pode estar relacionado com o pH da Maemba que é mais alcalino.

A densidade de ionócitos na superfície branquial em contato com o meio aquáticos não diferiu entre os peixes das diferentes lagoas, sugerindo que, para manter o equilíbrio osmótico os peixes utilizaram outros mecanismos, como por exemplo a variação da área fracional. Como mostrado por Greco (1996), o aumento

da área fracional de ionócitos favorece a absorção de íons. Com base nos resultados observados neste estudo, supõe-se que os peixes do ponto 1 da Maemba apresentaram a maior área fracional dos ionócitos nas brânquias como estratégia para manter a osmolalidade. A menor área fracional dos ionócitos nos peixes de Maemba ponto 2, é difícil de explicar uma vez que esses peixes apresentaram homeostasia iônica.

Por outro lado, os peixes de Carapebus apresentaram estratégia oposta, na qual a menor área fracional de ionócitos pode ser interpretada como um mecanismo de regulação para limitar a absorção de íons por difusão em resposta à salinidade, considerando a correlação positiva apresentada por Perry et al. (1992) entre a área de ionócitos e a taxa de captação de íons em peixes de água doce. Entretanto, é importante enfatizar que em peixes de ambientes salinos, a principal função dos ionócitos é a excreção de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  uma vez que ganham esses íons por difusão e precisam excretá-los ativamente para manutenção da homeostasia iônica.

A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mais alta nos rins é esperado, pois ela é a principal responsável por manter os gradientes eletroquímicos necessários para a secreção e reabsorção nos túbulos renais (Nishimura e Fan, 2003). Em ambientes hiperosmóticos, os peixes tendem a perder água para o ambiente por osmose, um mecanismo compensatório para essa perda envolve a reabsorção de água pelos rins, produzindo urina em menor quantidade e mais concentrada. Para ocorrer a reabsorção de água pelos túbulos renais é necessário um gradiente osmótico que favoreça a reabsorção, resultado da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase que é responsável pela regulação do gradiente eletroquímico (Marshall e Grosell 2005). A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase observada nos rins dos peixes de Carapebus foi mais alta que a observada nos peixes do ponto 1 da Maemba e do que a Alegre, isso sugere uma maior demanda dessa atividade para gerar um gradiente favorável para a reabsorção de água e conseqüentemente, a produção de urina mais concentrada. Entretanto, nos peixes do ponto 2 da Maemba, a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nos rins pode estar refletindo a necessidade de reabsorção de  $\text{Na}^+$ , visto que em peixes de água doce a tendência é que os peixes percam íons para o meio. Dessa forma é necessário a reabsorção, que ocorre por influência do gradiente eletroquímico gerado pela atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Tang et al., 2010) e a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias desses

peixes foi menor. A reabsorção ocorre pelos canais de  $\text{Na}^+$  e trocadores como  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que estão localizados na membrana apical (Perry, 1997).

O acúmulo de Cu pode interferir na regulação dos íons  $\text{Na}^+$ , comprometendo a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e conseqüentemente inibindo o transporte desse íon (Playle et al., 1992 e 1993). A presença do Cu no meio aquático muitas vezes pode ser proveniente de águas residuais industriais e por deposição de material particulado atmosférico de indústrias metalúrgicas (Davis et al., 2000), padrões que se alinham com fatores ambientais presentes na lagoa Maemba.

Foi observado que os peixes do ponto 1 da Maemba apresentaram a menor atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e da  $\text{H}^+$ -ATPase nos rins, isso pode estar associada com a concentração de Cu nesse tecido. Entretanto, um padrão oposto ocorreu nos peixes da Maemba 2, as quais apresentaram a maior atividade dessas enzimas nos rins, junto com os peixes de Carapebus. Embora a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+$ -ATPase ter sido diferente entre os peixes do ponto 1 e do ponto 2 da Maemba, a concentração de Cu nos rins desses peixes não diferiram. As diferenças observadas em Maemba ponto 1 e ponto 2, pode estar associada a alguma interação do Cu ou competição com outro metal resultando em respostas diferentes nesses peixes. Além disso, a análise de outros metais revelou concentrações semelhantes entre os peixes dos dois pontos, sugerindo que as diferenças nas atividades ATPases não podem ser completamente atribuídas às diferentes concentrações de metais. Portanto, são necessárias investigações adicionais para esclarecer as respostas observadas nos rins desses peixes.

O aumento da concentração de Sr na água no estudo conduzido por Klaczek et al., (2022) não afetou a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e da  $\text{H}^+$ -ATPase; no caso da lagoa Carapebus, a análise de correlação e a PCA também não relacionaram a atividade dessas enzimas a concentração de Sr, dessa forma o que pode estar fazendo com que a atividade dessas enzimas nas brânquias dos peixes de Carapebus diferencie dos peixes da Maemba e Alegre seja a salinidade. Assim como apontado por Klaczek et al., (2022), o Sr na coluna d'água na lagoa Carapebus foi absorvido e acumulado de forma significativa nos tecidos das brânquias. Na lagoa Carapebus foram observados acumulação de Sr tanto nas brânquias quanto nos rins superiores a acumulação nesses tecidos dos peixes dos outros locais, entretanto a concentração no plasma não diferiu possivelmente devido a transferência desse metal para os

tecidos de outros órgãos como observado nas brânquias e rins dos peixes em Carapebus.

Os peixes coletados no ponto 2 da Maemba tiveram respostas semelhantes as observadas nos peixes de Carapebus. Entretanto, é relevante ressaltar que as lagoas diferem em características como o pH e a salinidade, levantando questões sobre quais fatores podem estar relacionados com os resultados observados. Portanto, são necessárias investigações mais aprofundadas para compreender os mecanismos envolvidos nessas respostas.

## 5. Conclusão

A análise dos mecanismos de regulação osmótica e iônica é fundamental para compreender os efeitos dos contaminantes na sobrevivência de *Oreochromis niloticus* em lagoas próximas a atividades metalúrgicas. Nesse contexto, é essencial considerar os parâmetros físico-químicos da água, pois estes podem influenciar na especiação dos contaminantes, incluindo metais, e impactar indiretamente a atividade das enzimas envolvidas na osmorregulação dos peixes. Características como o pH mais alcalino da lagoa Maemba e as condições de água salobra de Carapebus afetaram os mecanismos bioquímicos e morfológicos responsáveis pela regulação osmótica e iônica.

Baseando-se nas características das lagoas, esperava-se que as respostas nos mecanismos osmorregulatórios fossem distintas. No entanto, os mecanismos observados nos rins dos peixes do ponto 2 da Maemba e de Carapebus indicaram ajustes bioquímicos e morfológicos semelhantes. Apesar das condições ambientais diversas em Alegre, Maemba e Carapebus, a osmolalidade dos peixes se manteve dentro dos parâmetros estabelecidos para *O. niloticus*. Isso demonstra que, apesar dos desafios ambientais, os peixes localizados próximos às atividades metalúrgicas e em Alegre, influenciados por outras atividades, conseguiram manter condições internas favoráveis para o funcionamento metabólico. Este estudo destaca a complexibilidade das interações nos ambientes naturais e a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os mecanismos osmorregulatórios em peixes de lagoas próximas a atividades metalúrgicas.

## Referência

AFOLALU, S.A., IKUMAPAYI, O.M., OGEDENGBE, T.S., KAZEEM, R.A., OGUNDIPE, A.T.. Waste pollution, wastewater and effluent treatment methods—an overview. **Materials Today: Proceedings**. 62, 3282-3288, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.231>

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

BIANCHINI, A.P.; CARVALHO DE CASTILHO, P. Effect of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 62, 63–69, 1999. <https://doi.org/10.1007/s001289900842>

CHEN, Y., ZHANG, S.H., HUANG, D.S., LI, B.L., LIU, J.G., LIU, W.J., MA, J., WANG, F., WANG, Y., WU, S.J.. The development of China's Yangtze River Economic Belt: how to make it in a green way? **Science Bulletin**. 62 (9), 648-651, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.04.009>

CHEN, L., ZHOU, S., WU, S., WANG, C., HE, D.. Concentration, fluxes, risks, and sources of heavy metals in atmospheric deposition in the Lihe River watershed, Taihu region, eastern China. **Environmental Pollution**. 255, 113301, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113301>

CORNELIS, R., NORDBERG, M.. General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation. In: Gunnar FN, Bruce AF, Monica N, Lars TF (eds) Handbook on the toxicology of metals, 3rd edn. Academic Press, Burlington, pp 197–208, 2007.

CUI, Y., JI, D., HE, J., KONG, S., WANG, Y.. In situ continuous observation of hourly elements in PM<sub>2.5</sub> in urban Beijing, China: occurrence levels, temporal variation, potential source regions and health risks. **Atmospheric Environment**. 222, 117164, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117164>

DAVIS, R.A., JR.; WELTY, A.T.; BORREGO, J.; MORALES, J.A.; PENDON, J.G.; RYAN, J. Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. **Environmental Geology**. 39, 1107–1116, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002549900096>

DUARTE, I.D., SILVA, N.H.V.F., SOUZA, I.C. OLIVEIRA, L.B., ROCHA, L.D., MOROZESK, M., BONOMO, M.M., PEREIRA, T.A. DIAS, M.C., FERNANDES, V.O., MATSUMOTO, S.T. Water quality of a coastal lagoon (ES, Brazil): abiotic aspects, cytogenetic damage, and phytoplankton dynamics. **Environmental Science and Pollution Research**. 24, 10855–10868, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8721-2>

EL ZRELLI, R., YACOUBI, L., WAKKAF, T., CASTET, S., GRÉGOIRE, M., MANSOUR, L., COURJAULT-RADÉ, P., RABAOU, L.. Surface sediment enrichment with trace metals in a heavily human-impacted lagoon (Bizerte Lagoon, Southern Mediterranean Sea): Spatial distribution, ecological risk assessment, and implications for environmental protection. **Marine Pollution Bulletin**. 169, 112512, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112512>

EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M., CHOE, K.P.. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**. 85 (1), 97–177, 2005. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>

EVANS D. H., CLAIBORNE J. B.. “Osmotic and ionic regulation in fishes,” in **Osmotic and ionic regulation. Cells and animals**. Editor D. H. Evans (Boca Raton, FL, Oxford, New York: CRC Press), 295–366, 2009.

FERNANDES, M.N., MORON, S.E., SAKURAGUI, M.M.. Gill morphological adjustments to environment and gas exchange function in: Fernandes, MN., Rantin, F.T., Glass, M.L., Kapoor, B.G. (Eds.), **Fish Respiration and Environment Science Publishers**, New Hampshire, pp. 93-120, 2007.

FERNANDES, M.N.. Gills: Respiration and Ionic-Osmoregulation, Chapter 15, 246-266. In: **Histology of Fishes** (K. Formicki, F. Kirschbaum, Eds.), **CRC Press**, Boca Raton, FL, USA, pp 448. 2020.

GIBBS, A., SOMERO, G. N.. Pressure adaptation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. **Journal Experimental Biology**. 143, 475-492, 1989. <https://doi.org/10.1242/jeb.143.1.475>

GONG, X., DING, Q., JIN, M., ZHAO, Z., ZHANG, L., YAO, S., XUE, B.. Recording and response of persistent toxic substances (PTSs) in urban lake sediments to anthropogenic activities. **Science of The Total Environment**. 777, 145977, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145977>

GRECO, A., FENWICK, J. & PERRY, S.. The effects of soft-water acclimation on gill structure in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Cell and Tissue Research**. 285, 75–82, 1996. <https://doi.org/10.1007/s004410050622>

GROSELL, M., GERDES, R., BRIX, K.V. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 143, 473–483, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.014>

HWANG, P.P.; LEE, T.H.. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**. 148, 479-497, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.416>

HOMMEN, U., BAVECO, J., GALIC, N. AND VAN DEN BRINK, P.J.. Potential application of ecological models in the European environmental risk assessment of chemicals I: Review of protection goals in EU directives and regulations. **Integrated**

**Environmental Assessment and Management.** 6, 325-337, 2010.  
<https://doi.org/10.1002/ieam.69>

KAMMERER, B.D., SARDELLA, B.A., KÜLTZ, D.. Salinity stress results in rapid cell cycle changes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gill epithelial cells. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology.** 311(2), 80-90, 2008. <https://doi.org/10.1002/jez.498>

KLACZEK, C.E., SAARI, G.N., VEILLEUX, H.D., MIELEWCZYK, D.A., GOSS, G.G., GLOVER, C.N.. Acute waterborne strontium exposure to rainbow trout: Tissue accumulation, ionoregulatory effects, and the modifying influence of waterborne calcium. **Aquatic Toxicology.** 245, 106125, 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106125>

KULTZ, D.; SOMERO, G.N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. **Journal Experimental Biology.** 98, 1883–1894, 1995. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.9.1883>

LEE, T.H., HWANG, P.P., SHIEH, Y.E., LIN, C.H.. The relationship between 'deep-hole' mitochondria-rich cells and salinity adaptation in the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry.** 23, 133-140, 2000.  
<https://doi.org/10.1023/A:1007818631917>

MARSHALL, W.S., GROSELL, M.. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans, D.H., Claiborne, J. (Eds.), **The Physiology of Fishes.** CRC Press, Boca Raton, pp. 177–230, 2005.

MOHAMED, N., SAAD, M., SHUKRY, M., EL-KEREDY, A.M.S., NASIF, O., DOAN, H.V., DAWOOD, M.A.O.. Physiological and ion changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under the effect of salinity stress. **Aquaculture Reports.** 19. 100567, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100567>

MORIN-CRINI, N., LICHTFOUSE, E., LIU, G. BALARAM, V., RIBEIRO, A.R.L., LU, Z., STOCK, F., CARMONA, E., TEIXEIRA, M.R., PICOS-CORRALES, L.A., MORENO-PIRAJÁN, J.C., GIRALDO, L., LI, C., PANDEY, A., HOCQUET, D., TORRI, G., CRINI, G.. Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. **Environmental Chemistry Letters.** 20, 2311–2338, 2022.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-022-01447-4>

NISHIMURA, H., AND FAN, Z.. Regulation of water movement across vertebrate renal tubules. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.** 136, 479–498, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00162-4)

NIYOGI, S., KENT, R., WOOD, C.M.. Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a biotic ligand model (BLM) approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.** 148, 305–314, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.015>

PERRY, S.F., GOSS, G.G., LAURENT, P.. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. **Canadian Journal of Zoology**. 70, 1775–1786, 1992. <https://doi.org/10.1139/z92-245>

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*. 59, 325–347, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.325>

PLAYLE, R.C., GENSEMER, R.W., DIXON, D.G.. Copper accumulation on gills of fathead minnows: Influence of water hardness, complexation and pH on the gill micro-environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 11: 381–391, 1992. <https://doi.org/10.1002/etc.5620110312>

PLAYLE, R.C., DIXON, D.G., BURNISON, K.D.. Copper and cadmium binding to fish gills: Estimates of metal–gill stability constants and modeling of metal accumulation. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 50, 2678–2687, 1993. <https://doi.org/10.1139/f93-291>

SANCHO, E., FERNANDEZ-VEJA, C., FERRANDO, M.D., ANDREU-MOLINER, E.. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56, 434–441, 2003.

SANTOS, J.M., REIS, N.C., GALVÃO, E.S., SILVEIRA, A., GOULART, E.V., LIMA, A.T.. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**. 24, 22026–22039, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9677-y>

SANTOS, J.M.; JÚNIOR, N.C.R.; GALVÃO, E.S.. **Material particulado na atmosfera urbana e suas interações com a saúde humana**. Goiânia: Editora: Alta Performance – 1ª edição, 2022.

SOUZA, I.D.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.. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Science of The Total Environment**. V: 640-641, 501-511, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.302>

TANG, C. H., WU, W. Y., TSAI, S. C., YOSHINAGA, T., AND LEE, T. H.. Elevated Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase responses and its potential role in triggering ion reabsorption in kidneys for homeostasis of marine euryhaline milkfish (*Chanos chanos*) when acclimated to hypotonic fresh water. **Journal of Comparative Physiology B**. 180, 813–824, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0458-x>

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Framework for metals risk assessment. Office of the Science Advisor, Risk Assessment Forum. Washington, DC: EPA/120/R-07/001. 2007

VIEIRA, V.S. E MENEZES, R.G. Geologia e Recursos Minerais do Estado do Espírito Santo. CPRM, Belo Horizonte, 289 p. 2015.

VIJAYAVEL, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. **Chemosphere**. 69, 979-986, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.011>

YANG, S., YAN, T., ZHAO, L., WU, H., DU, Z., YAN, T., XIAO, Q.. Effects of temperature on activities of antioxidant enzymes and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, hormones release in *Schizothorax prenanti*. **Journal of Thermal Biology**. 72, 155-160, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.02.005>

## CAPÍTULO IV

---

### CONCLUSÕES GERAIS

## CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho utilizou duas abordagens diferentes para avaliar os mecanismos de ajuste fisiológico, morfológico e bioquímico em *O. niloticus*, coletados em diferentes locais, possibilitando uma comparação entre as diferentes condições em que esta espécie está inserida. Foram considerados a avaliação dos parâmetros hematológicos e imunológicos, além da avaliação dos possíveis efeitos nos mecanismos osmorregulatórios e de regulação do equilíbrio ácido-base tanto nas brânquias quanto nos rins de *O. niloticus*.

A complexibilidade das interações existentes entre contaminantes e seus efeitos na fisiologia de um peixe são desafios enfrentados pela ecotoxicologia de estudos em campo. Um dos principais desafios é o que pode estar ocasionando os efeitos observados no peixe, sendo que não se pode ignorar as relações de antagonismo e sinergia que existe entre os elementos de um corpo hídrico e mesmo no interior dos animais.

As características de cada local de coleta possibilitaram uma possível interpretação das causas dos efeitos observados, mas não é possível afirmar com certeza. Alegre por exemplo, apesar de não possuir indústrias metalúrgicas em seu entorno, apresenta a atividade de exploração de mármore e granito, além de apresentar características geológicas que provavelmente favoreceram a concentração de metais na água e sedimento. Alegre apresentou concentrações altas de alguns metais na água e sedimento, mas a concentração de metais nos eritrócitos e plasma foram menores e houve menor influência negativa nos parâmetros sanguíneos e imunológicos da espécie. Por outro lado, a lagoa Maemba e Carapebus, apesar de apresentarem menor concentração de metais na água e sedimento, foram as que apresentaram mais efeitos negativos nessas variáveis. Sendo que os peixes de Maemba ponto 1 apresentaram anemia e os peixes de Carapebus mutagenicidade, além de alterações nas respostas imunológicas.

Os biomarcadores de regulação osmótica e iônica e de equilíbrio ácido-base, mostrou, apesar dos locais de coleta serem distintos, tanto em concentração de metais quanto nas características físico-químicas da água, respostas distintas no organismo. Entretanto, a osmolalidade dos peixes coletados estava dentro dos parâmetros esperados para a espécie, ou seja, apesar dos desafios e dos diferentes

mecanismos de controle, os peixes conseguiram manter o equilíbrio osmótico e iônico. No caso do presente estudo, os peixes estão expostos aos contaminantes e as variações dos parâmetros físico-químicos constantemente, dessa forma, é esperado que já ajustaram mecanismos para responder a essas alterações. Entretanto, é importante ressaltar que *O. niloticus* é uma espécie resistente, dessa forma os efeitos observados neste estudo podem não ser os mesmos em espécies mais sensíveis. Observando os resultados obtidos, é notório como é complexo o funcionamento da regulação osmo-iônica. Apesar de ambientes muito diferentes, brânquias e rins dos peixes do ponto 2 da Maemba e de Carapebus, apresentaram mecanismos semelhantes. Dessa forma, é importante dar continuidade a pesquisa nesses locais para entender melhor os fatores que podem ter gerado as respostas observadas.

De modo geral, os peixes de Alegre foram os menos impactados pela presença de metais na água; os de Maemba ponto 1 apresentaram anemia normocítica hipocrômica, menor concentração de íons  $K^+$  e a menor osmolalidade, sendo que a osmolalidade, ainda assim está dentro dos parâmetros esperados para a espécie. Os peixes da lagoa Carapebus apresentaram mutagenicidade pela presença de micronúcleo e maior concentração de íons  $Cl^-$ , provavelmente devido a característica salobra da lagoa.

Portanto, os biomarcadores hematológicos, imunológicos e genotóxicos foram responsivos assim como os relacionados a regulação iônica evidenciando diferença nas características dos diferentes locais. Este estudo deve ser considerado como um impulsionador, para que ocorra o monitoramento da espécie nessas lagoas, de forma que seja possível entender a dinâmica entre as fontes contaminantes dessas áreas e seus efeitos na fisiologia das espécies ali existente.