

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

HENRIQUE AIO ADORNO

EFEITO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO  
(MPA) SEDIMENTÁVEL PROVENIENTE DA ATIVIDADE  
SIDERÚRGICA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE TILÁPIA,  
*Oreochromis niloticus*

SÃO CARLOS - SP  
2021

HENRIQUE AIO ADORNO

EFEITO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO  
(MPA) SEDIMENTÁVEL PROVENIENTE DA ATIVIDADE  
SIDERÚRGICA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA DE TILÁPIA,  
*Oreochromis niloticus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais<sup>1</sup>.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a) Diana Amaral Monteiro

SÃO CARLOS - SP  
2021

---

<sup>1</sup> Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Aio Adorno, Henrique

Efeito do Material Particulado Atmosférico (MPA)  
Sedimentável proveniente da atividade siderúrgica sobre  
a função cardíaca de tilápia, *Oreochromis niloticus* /  
Henrique Aio Adorno -- 2021.  
15of.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São  
Carlos, campus São Carlos, São Carlos  
Orientador (a): Diana Amaral Monteiro  
Banca Examinadora: Luiz Henrique Florindo, Marisa  
Narciso Fernandes  
Bibliografia

1. Contratilidade cardíaca. 2. Material particulado  
atmosférico. 3. Ecotoxicologia. I. Aio Adorno, Henrique.  
II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Henrique Aio Adorno, realizada em 30/07/2021.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro (UFSCar)

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo (UNESP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a minha orientadora Diana Amaral Monteiro pela paciência, dedicação e atenção em me ensinar técnicas que eu sequer tinha conhecimento. Por ter se tornado uma amiga, por seus conselhos que valem para a vida e principalmente pelo incentivo mesmo com as diversas dificuldades encontradas ao longo do Mestrado. Muito obrigado pela oportunidade que me foi concedida, por sua compreensão em momentos difíceis e por sua incrível dedicação ao trabalho! Espero que outros alunos tenham a oportunidade de ter um orientador(a) igual a você, pessoalmente e profissionalmente, e que tenha pelo menos uma fração da sua dedicação e amor pelo trabalho.

Agradeço todo suporte e carinho por parte da minha família ao longo dessa jornada. Pai, Mãe e Irmã, palavras não são suficientes para agradecer. Mesmo não entendendo ao certo qual era meu trabalho e minhas atividades, nunca deixaram de me apoiar. Agradeço também aos meus tios Cida e Cássio, e aos meus primos Júlio César e João Paulo, por essa amizade que perdura desde nossa infância.

Agradeço aos meus grandes amigos Guilherme, Karolina, Afonso, Matheus Vô, Paulão, Biga, Mari Chagas, Danilo e Bianca. MUITÍSSIMO obrigado pela amizade, conversas e momentos de felicidade compartilhados ao longo desses anos. Carrego todos vocês em meu coração. Obrigado por fazerem parte da minha história.

Agradeço todas as amizades que fiz ao entrar no laboratório. Muito obrigado pela ajuda nas coletas, elaboração do trabalho, conversas sobre a vida e principalmente pelos momentos de felicidade e distração no laboratório: Fabrício, Nathan, Eliton, Beatriz, Karina, Sr Angelo, Gustavo, Will, Rocco, Carol, Michelly, Israel, Driele e Livia.

Agradeço à Professora Marisa, por sempre manter seu laboratório de portas abertas e permitir que eu utilizasse os equipamentos e suprimentos. Ao laboratório de Física Aplicada do Instituto de Física de São Carlos, USP *campus* II, por compartilhar o uso de equipamentos e contribuir com o desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Ciências Ambientais, Departamento de Ciências Fisiológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, em especial ao Vini e ao Prof. Marcel. Muito obrigado pelas respostas rápidas e precisas nos momentos de dúvidas.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto temático intitulado “*Material Particulado Atmosférico e contaminação ambiental: Avaliação do impacto na biota aquática em uma abordagem ecofisiotoxicológica integrada*”, FAPESP Proc. 2019/08491-0.

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

## RESUMO

ADORNO, H. A. Efeito do material particulado atmosférico (MPA) sedimentável proveniente da atividade siderúrgica sobre a função cardíaca de tilápia, *Oreochromis niloticus*. 2021 – 150 p: Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, São Carlos – 2021.

A atividade industrial para obtenção e processamento de ligas metálicas, ferro e aço resultam na emissão do Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPAS). Indústrias siderúrgicas localizadas no Complexo do Tubarão, na Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV), Vitória - ES, emitem uma fumaça metálica comumente chamada de “pó preto” que contém uma composição variada de metais e nanopartículas metálicas que se deposita nos ambientes aquáticos. Diante de um cenário que busca a produção de informações que possam auxiliar a gestão sustentável de recursos hídricos, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos da exposição aguda (96 horas) das concentrações subletais de 0,01 g.L<sup>-1</sup>, 0,1 g.L<sup>-1</sup> e 1,0 g.L<sup>-1</sup> do MPAS sobre a contratilidade miocárdica de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. O grupo exposto a 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS apresentou valores significativamente superiores de força de contração (Fc) e de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) em todas as frequências de estimulação. Nos animais expostos, os parâmetros tempo-dependentes (TPT = tempo para pico de tensão, e THR = tempo para 50% do relaxamento) foram inferiores, enquanto as taxas de contração e relaxamento foram superiores. Todos os grupos apresentaram decaimento da Fc após a pausa diastólica não fisiológica de 300 segundos, sendo mais acentuado nos grupos expostos, sugerindo um papel proeminente do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) na extrusão de cálcio. Como a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS apresentou efeitos pronunciados na contração cardíaca, foram adicionalmente investigados os efeitos dessa exposição sobre parâmetros hematológicos e biomarcadores plasmáticos de resposta ao estresse e de estresse oxidativo. As alterações na contratilidade miocárdica dos peixes expostos ao MPAS foram associadas a resposta ao estresse, caracterizada pelo aumento significativo dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose. As tilápias expostas ao MPAS também apresentaram uma redução significativa do conteúdo de hemoglobina indicando um possível estado de hipoxemia, o que pode demandar ajustes no débito cardíaco, com o aumento da Fc para aumentar o volume sistólico. Os peixes expostos apresentaram maiores valores de índices hepatossomático e de massa ventricular relativa, provavelmente associado a sobrecarga de atividade do coração e fígado. Adicionalmente, a exposição ao MPAS induziu aumentos significativos nos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação protéica no plasma, indicando estresse oxidativo e refletindo um desequilíbrio da homeostase redox. A expressão da proteína NCX não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando que os efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos estão associados as respostas β-adrenérgicas durante situações de estresse. Assim, os efeitos do MPAS podem impactar negativamente a adaptação, sobrevivência e sucesso reprodutivo da tilápia, visto que o requerimento energético para manter os padrões fisiológicos do sistema cardiovascular e os processos de desintoxicação demandados pela exposição do MPAS é elevado.

**Palavras-chave:** material particulado atmosférico sedimentável; função cardíaca; desempenho animal; biomonitoramento.

## ABSTRACT

The industrial activity for obtaining and processing metal alloys, iron and steel result in the emission of Sedimentable Atmospheric Particulate Material (SAPM). Mining-steel industries located in the “Complexo do Tubarão”, in Metropolitan Region of Vitoria (MRV), Vitoria – ES, emit a metal smoke commonly called "black powder" that contains a varied composition of metals and metal nanoparticles that are deposited in aquatic environments. Faced with a scenario that seeks to produce information that can help the sustainable management of water resources, the objective of this study was to evaluate the possible effects of acute exposure (96 hours) of sublethal concentrations of 0.01 g.L<sup>-1</sup>, 0.1 g.L<sup>-1</sup>, and 1.0 g.L<sup>-1</sup> of SAPM on myocardial contractility of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The group exposed to 1.0 g.L<sup>-1</sup> of SAPM showed significantly higher values of contraction force (Fc) and cardiac pumping capacity (CPC) at all stimulation frequencies. In the exposed animals, time-dependent parameters (TPT = time to peak tension, and THR = time to 50% of relaxation) were lower, while contraction and relaxation rates were higher. All groups exhibited a Fc decay after the non-physiological diastolic pause of 300 seconds, which was more conspicuous in the exposed groups, suggesting a prominent role of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) exchanger in calcium extrusion. As the 1.0 g.L<sup>-1</sup> concentration of SAPM showed pronounced effects on cardiac contraction, we also investigated the effects of this exposure on hematological parameters and plasma biomarkers of stress response and oxidative stress. Alterations in myocardial contractility in MPAS-exposed fish were associated with a stress response characterized by significant increases in plasma cortisol and glucose levels. Tilapia exposed to SAPM also showed a significant reduction in hemoglobin content indicating a possible hypoxemia state, which may require adjustments in cardiac output, with increased Fc to increase systolic volume. The exposed fish showed higher values of hepatosomatic index and relative ventricular mass, probably associated with the overload of activity of the heart and liver. Additionally, SAPM exposure induced significant increases in plasma levels of lipid peroxidation and protein carbonylation, indicating oxidative stress and reflecting an imbalance of redox homeostasis. NCX protein expression showed no significant difference between the groups, indicating that the positive inotropic and lusitropic effects are associated with β-adrenergic responses during stress situations. Thus, the effects of SAPM may negatively affect the adaptation, survival and reproductive success of tilapia, as the energy requirement to maintain the physiological patterns of the cardiovascular system and the detoxification processes demanded by SAPM exposure is high.

**Keywords:** sedimentable atmospheric particulate matter; cardiac function; animal performance; biomonitoring.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Esquema de emissão e deposição do MPAS em sistemas aquáticos .....   | 22 |
| <b>Figura 2</b> - Acoplamento excitação-contração de mamíferos.....  | 27 |
| <b>Figura 3</b> - Foto de um exemplar de tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> .....   | 30 |
| <b>Figura 4</b> - Localização do Complexo do Tubarão e da Ilha do Boi, Vitória - ES .....  | 33 |
| <b>Figura 5</b> - Foto panorâmica do complexo do Tubarão e emissão de fumaça .....   | 34 |
| <b>Figura 6</b> - Foto panorâmica do complexo do Tubarão e pontos de emissão do pó preto .....   | 34 |
| <b>Figura 7</b> - Foto do acúmulo de pó preto em uma residência de Vitória – ES .....  | 35 |
| <b>Figura 8</b> - Foto do acúmulo de pó preto em papel.....  | 35 |
| <b>Figura 9</b> - Foto do pó preto (MPAS) bruto .....  | 36 |
| <b>Figura 10</b> - Fluxograma da coleta do MPAS e dos exemplares de tilápia-do-Nilo....  | 37 |
| <b>Figura 11</b> - Sonda multiparâmetro Orion Star™ A329.....  | 39 |
| <b>Figura 12</b> - Fibox 3 Mini Sensor Oxygen Meter .....  | 40 |
| <b>Figura 13</b> - Fluxograma de exposição e preparo das tiras ventriculares .....   | 42 |
| <b>Figura 14</b> - Remoção do coração e preparação das tiras ventriculares .....   | 43 |
| <b>Figura 15</b> - Setup experimental .....  | 44 |
| <b>Figura 16</b> - Setup experimental: cubeta e micro-estirador .....  | 45 |
| <b>Figura 17</b> - Ilustração da cubeta experimental e seus componentes.....   | 46 |
| <b>Figura 18</b> - Ilustração do micro-estirador e seus componentes.....   | 47 |
| <b>Figura 19</b> - Exemplo de registros do Protocolo Efeito do tempo no software de aquisição de dados AcqKnowledge.....   | 48 |
| <b>Figura 20</b> - Exemplo de registros do Protocolo Efeito do Incremento gradual na Frequência de Estimulação Elétrica no software de aquisição de dados AcqKnowledge ..... | 49 |
| <b>Figura 21</b> - Exemplo de registros do Protocolo Potenciação pós-pausa no software de aquisição de dados AcqKnowledge.....   | 50 |
| <b>Figura 22</b> - Fluxograma da aplicação dos protocolos experimentais nas tiras ventriculares .....  | 51 |
| <b>Figura 23</b> - Parâmetros avaliados nos registros de força de contração isométrica das tiras ventriculares .....   | 53 |
| <b>Figura 24</b> - Efeito do tempo na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....  | 65 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 25</b> - Efeito do tempo no tempo para pico de tensão das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....  | 66 |
| <b>Figura 26</b> - Efeito do tempo no tempo para metade do relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....   | 68 |
| <b>Figura 27</b> - Efeito do tempo no tempo na taxa de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos.....  | 69 |
| <b>Figura 28</b> - Efeito do tempo no tempo na taxa de relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos.....  | 71 |
| <b>Figura 29</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no desenvolvimento de força das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos ...             | 73 |
| <b>Figura 30</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....        | 75 |
| <b>Figura 31</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no tempo para 50% do relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos ...        | 76 |
| <b>Figura 32</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na taxa de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....                  | 78 |
| <b>Figura 33</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na taxa de relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....                | 79 |
| <b>Figura 34</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na tensão de repouso das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos .....                  | 81 |
| <b>Figura 35</b> - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na capacidade de bombeamento cardíaco das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos ..... | 82 |
| <b>Figura 36</b> - Força de contração e Tensão de repouso em relação a valores iniciais dos grupos controle e MPAS 001 .....  | 84 |
| <b>Figura 37</b> - Força de contração e Tensão de repouso em relação a valores iniciais dos grupos controle e MPAS 01 .....   | 85 |
| <b>Figura 38</b> - Força de contração e Tensão de repouso em relação a valores iniciais dos grupos controle e MPAS 1 .....  | 86 |
| <b>Figura 39</b> - Efeito de pausas na estimulação elétrica na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e MPAS 001 .....                                  | 87 |
| <b>Figura 40</b> - Efeito de pausas na estimulação elétrica na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e MPAS 01 .....                                   | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 41</b> - Efeito de pausas na estimulação elétrica na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e MPAS 1..... | 89  |
| <b>Figura 42</b> - Massa Ventricular Relativa (MVR) dos grupos controle e MPAS 1 .....  | 91  |
| <b>Figura 43</b> - Índice hepatossomático (IHS) dos grupos controle e MPAS 1 .....  | 92  |
| <b>Figura 44</b> - Valores médios de hemoglobina total (g/dl) dos grupos controle e MPAS 1 .....  | 93  |
| <b>Figura 45</b> - Valores médio da proteína plasmática total dos grupos controle e MPAS 1 .....  | 94  |
| <b>Figura 46</b> - Valores médios de cortisol plasmático dos grupos controle e MPAS 1 ..  | 95  |
| <b>Figura 47</b> - Valores médios da glicose plasmática dos grupos controle e MPAS 1 ..   | 96  |
| <b>Figura 48</b> - Valores médios de GSH no plasma e coração dos grupos controle e MPAS 1 .....   | 97  |
| <b>Figura 49</b> - Valores médios da peroxidação lipídica no plasma e coração dos grupos controle e MPAS 1 .....                            | 98  |
| <b>Figura 50</b> - Valores médios da proteína carbonilada no plasma e coração dos grupos controle e MPAS 1 .....                            | 99  |
| <b>Figura 51</b> - Expressão da proteína NCX dos grupos controle e MPAS 1 .....   | 100 |
| <b>Figura 52</b> - Síntese dos principais resultados encontrados no trabalho .....  | 126 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1</b> - Características físico-químicas da água dos grupos controle e dos grupos expostos MPAS 001 (0,01 g.L <sup>-1</sup> ), MPAS 01 (0,1 g.L <sup>-1</sup> ) e MPAS 1 (1,0 g.L <sup>-1</sup> ) ao MPAS. .... | 62  |
| <b>Tabela 2</b> - Parâmetros biométricos de tilápias do grupo controle e exposto ao MPAS na concentração de 1,0 g.L <sup>-1</sup> . Os valores são médias ± EPM. ....  | 90  |
| <b>Tabela 3</b> - Concentração de metais (µg/g) em amostras de MPAS. Lote de MPAS coletado na estação seca (Abril – Agosto) de 2018. ....  | 101 |
| <b>Tabela 4</b> - Concentração de metais (µg.L <sup>-1</sup> ) em amostras de água dos grupos controle e exposto ao MPAS (1,0 g.L <sup>-1</sup> ). Dados expressos em média ± EPM. ....                                  | 102 |

## TABELA DE ABREVIATURAS E SIGNIFICADOS

|          |  |
|----------|--|
| CAT      | - Catalase   |
| CBC      | – Capacidade de Bombeamento Cardíaco                                 |
| CSA      | – Área da seção transversal  |
| dFc/dT   | – Taxa de contração  |
| -dFc/dT  | – Taxa de relaxamento  |
| EPM      | – Erro Padrão da Média   |
| ERO      | – Espécies reativas de oxigênio                                      |
| Fc       | – Força de contração   |
| GPx      | – Glutathione peroxidase   |
| GSH      | – Glutathione reduzida   |
| Hb       | – Hemoglobina  |
| IHS      | – Índice hepatossomático   |
| LPO      | – Peroxidação lipídica   |
| K        | – Fator de condição  |
| MPA      | – Material Particulado Atmosférico (pó preto)                        |
| MPAS     | – Material Particulado Atmosférico Sedimentável (pó preto)           |
| MPAS 001 | – Grupo exposto ao MPAS (0,01 g.L <sup>-1</sup> )                    |
| MPAS 01  | – Grupo exposto ao MPAS (0,1 g.L <sup>-1</sup> )                     |
| MPAS 1   | – Grupo exposto ao MPAS (1,0 g.L <sup>-1</sup> )                     |
| MVR      | – Massa ventricular relativa   |
| NCX      | – trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>                         |
| PC       | – Proteína carbonilada   |
| RMGV     | – Região Metropolitana da Grande Vitória                             |
| RS       | – Retículo Sarcoplasmático   |
| RT       | – Tensão de repouso ou linha de base                                 |
| SOD      | – Superóxido dismutase   |
| THR      | – Tempo para 50% do relaxamento (“ <i>time to half relaxation</i> ”) |
| TPT      | – Tempo para pico de tensão (“ <i>time to peak tension</i> ”)        |
| TR       | – Tensão de repouso  |
| U.A.     | – Unidades arbitrárias   |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>15</b> |
| 1.1 Caracterização do Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPAS)      | 18        |
| 1.2 Biomarcadores de estresse em peixes   | 23        |
| 1.3 Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo                             | 24        |
| 1.4 Biomarcadores fisiológicos  | 25        |
| 1.5 Considerações sobre a espécie estudada                                      | 29        |
| <b>2 OBJETIVOS</b>  | <b>31</b> |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>32</b> |
| 3.1 Aprovação no Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA)                        | 32        |
| 3.2 Coleta e tratamento do Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPAS) | 32        |
| 3.3 Delineamento Experimental   | 36        |
| 3.4 Determinação das características físico-químicas da água                    | 38        |
| 3.4.1 Temperatura, pH e condutividade   | 38        |
| 3.4.2 Oxigênio dissolvido na água   | 39        |
| 3.4.3 Concentração de amônia na água  | 40        |
| 3.4.4 Alcalinidade  | 40        |
| 3.5 Estudo da contratilidade miocárdica <i>ex vivo</i>                          | 41        |
| 3.6 Aplicação dos protocolos experimentais                                      | 47        |
| 3.6.1 Efeito do tempo   | 47        |
| 3.6.2 Efeito de Incrementos graduais na frequência de estimulação elétrica      | 48        |
| 3.6.3 Pós-pausa   | 49        |
| 3.7 Forma de apresentação dos dados   | 51        |
| 3.8 Análises complementares após a exposição a 1,0 g.L <sup>-1</sup> de MPAS    | 53        |
| 3.8.1 Índices organo-somáticos  | 54        |
| 3.8.1.1 Índice hepatossomático (IHS)  | 54        |
| 3.8.1.2 Massa ventricular relativa (MVR)  | 54        |
| 3.8.1.3 Fator de condição (K)   | 55        |
| 3.8.2 Biomarcadores bioquímicos   | 55        |
| 3.8.2.1 Determinação de hemoglobina total                                       | 55        |
| 3.8.2.2 Determinação do teor de proteína total                                  | 56        |
| 3.8.2.3 Determinação da glicose plasmática                                      | 56        |
| 3.8.2.4 Determinação do cortisol plasmático                                     | 56        |
| 3.8.2.5 Determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH)                    | 57        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.8.2.6 Determinação dos níveis de lipoperoxidação (LPO) .....  | 57         |
| 3.8.2.7 Determinação do conteúdo de Proteína carbonilada (PC) .....   | 58         |
| 3.8.3 Procedimentos experimentais para análise de Wester Blotting.....  | 59         |
| 3.8.4 Análise multielementar de metais no MPAS e na água.....   | 60         |
| 3.9 Tratamento estatístico dos dados .....  | 61         |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | <b>62</b>  |
| 4.1 Determinação das características físico-químicas da água.....   | 62         |
| 4.2 Observação comportamental dos animais e do MPAS .....   | 63         |
| 4.3 Experimentos <i>ex vivo</i> .....   | 64         |
| 4.3.1 Protocolo efeito do tempo.....  | 64         |
| 4.3.2 Efeito dos incrementos graduais na frequência de estimulação elétrica .....   | 71         |
| 4.3.3 Tensão de repouso e porcentagem de alteração da força de contração .....  | 83         |
| 4.3.4 Potenciação pós-pausa (Força de contração).....   | 86         |
| 4.4 Determinação de parâmetros bioquímicos e biométricos do grupo controle e MPAS 1 .....                                   | 89         |
| 4.4.1 Índices organo-somáticos dos animais dos grupos controle e MPAS 1 .....   | 89         |
| 4.4.2 Hemoglobina total .....   | 92         |
| 4.4.3 Proteína plasmática total .....   | 93         |
| 4.4.4 Níveis plasmáticos de cortisol e glicose .....  | 94         |
| 4.4.5 Determinação do conteúdo de GSH no sangue total e coração.....  | 96         |
| 4.4.6 Peroxidação lipídica (LPO) no plasma e coração.....   | 97         |
| 4.4.7 Determinação dos valores médios de proteína carbonilada (PC) no plasma e coração .....                                | 98         |
| 4.4.8 Expressão do trocador NCX no ventrículo dos animais dos grupos controle e MPAS 1 .....                                | 99         |
| 4.4.9 Concentrações de metais em amostras de MPAS .....   | 100        |
| 4.4.10 Concentração de metais na água dos grupos controle e expostos ao MPAS na concentração de 1,0 g.L <sup>-1</sup> ..... | 101        |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | <b>103</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES</b> .....   | <b>126</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>130</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Ambientes aquáticos são constantemente afetados por atividades antrópicas, sendo alvos de fontes de poluição difusas e/ou pontuais, isto é, recebendo cargas de poluentes por meio de descarga direta de esgoto doméstico e industrial (poluição pontual), ou por vários pontos contaminados por pesticidas em uma área de lavoura (fonte difusa). A qualidade da água em corpos hídricos tem sido manejada para atender aos padrões de qualidade minimamente aceitáveis estabelecidos por legislação, que incluem os níveis máximos de poluentes considerados seguros (BARON et al., 2002; BOESCH, 2002; HOWARD-WILLIAMS; DAVIES-COLLEY; RUTHERFORD, 2010). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o órgão responsável pela classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como pelo estabelecimento de padrões de lançamento de efluentes para garantir o uso racional de recursos hídricos (CONAMA, 2019). Exemplos disso são as resoluções nº 357 (classificação e diretrizes de corpos d'água), nº 430 (padrões de lançamento de efluentes), de 2005 e 2011, respectivamente, que contemplam os valores máximos permitidos de 85 poluentes no ambiente para estabelecimento dos padrões de qualidade de água.

No entanto, tais regulações e normativas são desatualizadas e não atendem à real situação atual, caracterizada por um aumento na carga de substâncias contaminantes e pela presença crescente de contaminantes emergentes, nanopartículas e disruptores endócrinos que não são legislados e que são potencialmente nocivos à saúde humana e animal. Tal cenário aliado a escassez de alocação de recursos financeiros e a inexistência de um planejamento baseado em critérios ecotoxicológicos e ambientais vem causando sérios impactos aos ecossistemas aquáticos e à biota associada.

A poluição atmosférica possui caráter difuso e é responsável pela contaminação de ambientes terrestres (ALVES et al., 2015; NAM et al., 2008) e aquáticos (BOONYATUMANOND et al., 2006). Essa poluição é oriunda de atividades industriais e automotivas, que emitem fumaças de composições variadas, ou seja, possuem diversos elementos que alteram a ciclagem e distribuição natural desses elementos na atmosfera, impactando nos processos biogeoquímicos e contribuindo para o avanço da poluição (RODRIGUES, 2006).

O grau de visibilidade da poluição atmosférica é uma das principais características utilizadas quando se relatam a presença desses poluentes no ambiente (SANTOS et al., 2017). O poluente tido como objeto do presente estudo é o material particulado atmosférico sedimentável (MPAS) emitido na cidade de Vitória - ES, sendo a siderurgia, o pátio de estocagem de minério e os processos de pelotização de minério as três principais fontes poluidoras. De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, os materiais particulados são um conjunto de poluentes constituídos por poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera devido ao seu tamanho, sendo emitido principalmente por veículos automotores, processos industriais, queima de biomassa e ressuspensão de poeira do solo. Os materiais particulados causam impactos negativos diretos em populações humanas e animais, como perturbação (CRILLEY et al., 2009; WANG et al., 2017), desconforto e estresse psicológico (FARFEL et al., 2005; VALLACK; SHILLITO, 1998), sendo situações intensamente agravadas quando a fonte de poluição é industrial (CURERA et al., 2009).

Devido a precipitação contínua, a presença de MPAS no ar é um fator de contaminação de ecossistemas terrestres (GHIO; CARRAWAY; MADDEN, 2012; TÜRTSCHER et al., 2017) e ecossistemas aquáticos (ARRIVABENE et al., 2015). No Brasil, o MPAS possui influência das atividades minero-siderúrgicas, onde processam materiais metálicos próximos aos centros urbanos que contaminam a população via respiração (CAKMAK et al., 2014; SANTOS; REIS, 2011; SANTOS et al., 2017; VANOS; HEBBERN; CAKMAK, 2014).

Em ambientes aquáticos, os peixes se tornam mais vulneráveis à poluição e exposição de metais devido a sua alimentação e forma de vida, porque não são capazes de escapar dos efeitos desses poluentes (AUTHMAN, 2015). Por serem mais sensíveis a vários tipos de substâncias tóxicas em relação aos invertebrados, os peixes se tornam poderosas ferramentas de avaliação da saúde do ecossistema, por meio de suas mudanças em características fisiológicas, moleculares ou comportamentais, que indicam o estresse causado por determinada perturbação ambiental (HAYAT et al., 2016).

Uma das formas de se medir a integridade ecológica de um ambiente é utilizando bioindicadores, como os peixes, reduzindo a necessidade de se medir outras variáveis que tornariam o estudo mais complexo (FALCÃO et al., 2008). Os



peixes apresentam uma série de adaptações quando expostos às modificações ambientais, como a adição de um poluente em seu habitat. O número de agentes poluentes continuam a crescer ao redor do mundo, e muitos desses contaminantes afetam a saúde de peixes de diferentes formas (INCARDONA; SCHOLZ, 2017).

A utilização de variáveis físicas e químicas para avaliar a integridade ecológica de um ambiente podem não ser suficientes e eficientes. Sabemos que essas variáveis, juntamente com variáveis microbiológicas, tornaram-se uma importante ferramenta de classificação e enquadramento de corpos hídricos (GOULART; CALLISTO, 2003). No entanto, a descontinuidade temporal e espacial das amostragens, a baixa eficiência na detecção de alterações na diversidade de habitats e a insuficiência na avaliação de alterações em comunidades biológicas aquáticas são desvantagens evidentes (WHITFIELD, 2001).

A avaliação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos à nível de indivíduos contribui para o entendimento dos efeitos de xenobióticos sobre o ambiente aquático (HUGGETT et al., 1992). Por essa razão, o uso de características fisiológicas e bioquímicas para verificar o nível de dano funcional causado pelo acúmulo subletal de constituintes do MPAS são biomarcadores úteis para avaliação de risco (BALLESTEROS et al., 2009) e agregam valor ao conjunto de variáveis físico-químicas na caracterização de dano ambiental. Ademais, esses biomarcadores são capazes de fornecer indicações das possíveis limitações na alocação de energia em condições ambientais adversas.

Biomarcadores bioquímicos como os parâmetros hematológicos (níveis de hemoglobina), indicadores de estresse (níveis de cortisol e glicose), danos oxidativos (níveis de peroxidação lipídica e oxidação proteica) e níveis de antioxidantes (enzimáticos e não-enzimáticos como a glutathiona reduzida) estão entre as primeiras respostas aos contaminantes que informam sobre o mecanismo de ação dos mesmos e têm sido frequentemente utilizados em estudos sobre contaminação ambiental (BALLESTEROS et al., 2009; CARVALHO et al., 2017; MONTEIRO et al., 2017).

Por outro lado, características fisiológicas complexas, em particular as que remetem à integridade funcional e desempenho adequado frente a desafios fisiológicos, podem ser usadas como indicadores dos efeitos toxicológicos subletais da poluição aquática. O desempenho animal é diretamente relacionado com a presença de poluentes, como o MPAS proveniente da indústria siderúrgica. Nesse sentido, a contratilidade cardíaca de peixes é uma maneira de verificar a performance

cardíaca do animal (LOPES, 2009) que pode ser impactada pela presença de poluentes, os quais podem ser possíveis fatores de sobrecarga crônica do sistema cardiovascular, prejudicando a sobrevivência, tempo de vida e sucesso reprodutivo das espécies (INCARDONA; SCHOLZ, 2016). O desempenho individual do animal é prejudicado de duas maneiras: 1) desenvolvimento de anomalias severas no período larval, devido a perturbações da função cardiovascular como malformação do coração; 2) redução na performance fisiológica (HICKEN et al., 2011) capaz de comprometer o sucesso e/ou a sobrevivência do peixe na vida adulta

Assim, o comprometimento fisiológico subletal pode ser descrito adequadamente em experimentos laboratoriais e, com base nisso, suas consequências ambientais podem ser sugeridas com segurança. Uma dose subletal de um determinado poluente/químico pode afetar o coração e reduzir a função cardiorrespiratória posteriormente na vida do animal. A baixa capacidade cardíaca afeta diretamente a capacidade natatória do animal (ANTTILA et al., 2014), que o torna um alvo mais fácil para predadores, além de limitar sua busca por recursos. Atividades ecologicamente essenciais dependem da natação, como o forrageamento, fuga de predadores, proteção do território e migração. Portanto, o desempenho da bomba cardíaca é uma medida valiosa na determinação dos riscos associados às exposições subletais de peixes a diferentes contaminantes. As populações de peixes que habitam ambientes poluídos tendem a apresentar desempenho natatório (e. g.: velocidade de natação, velocidade natatória crítica, velocidade máxima de natação) reduzido em comparação com populações de áreas mais limpas (MCKENZIE et al., 2007).

### **1.1 Caracterização do Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPAS)**

Estudos demonstraram que a deposição atmosférica, outra importante fonte de poluição difusa, é responsável pela poluição da terra (ALVES et al., 2015; NAM et al., 2008) e água (BOONYATUMANOND et al., 2006), assim como a contaminação por metais (DUCE et al., 1991; FANG et al., 2012) e por nutrientes (CHIN et al., 1996; CHU et al., 2008; FANG et al., 2006; FENN et al., 2003; SARDANS; RIVAS-UBACH; PEÑUELAS, 2012; SHARMA; AGRAWAL; MARSHALL, 2008).

Normalmente a poluição atmosférica é relatada de acordo com o seu grau de visibilidade (SANTOS et al., 2017), ou seja, de acordo com o tamanho da partícula (quanto maior, mais visível). O tamanho das partículas de MPA provenientes dos

processos industriais contidos na atividade siderúrgica, uma das atividades mais impactantes e que geram poluição atmosférica, variam de acordo com as ligas metálicas utilizadas na cadeia de processos, a composição do minério original, processos industriais aplicados, temperatura de fusão e aditivos e outros elementos utilizados durante o processo (BADILLO-CASTAÑEDA et al., 2015). O MPA pode ser categorizado como grosso, fino, ultrafino e nanopartícula, que possui uma dimensão abaixo de 100  $\mu\text{m}$  (ARICK et al., 2015), este último, por sua vez, tem sido amplamente utilizado na produção de ferro e outras ligas metálicas para aumentar sua resistência (KUMAR et al., 2018). A CETESB utiliza indicadores de qualidade do ar, como o de Partículas Inaláveis ( $\text{MP}_{10}$ ) e Partículas Inaláveis Finas ( $\text{MP}_{2,5}$ ), sendo que o primeiro contempla as partículas que possuem diâmetro aerodinâmico  $\leq 10 \mu\text{m}$  e devido a isso podem ficar retidas na parte superior do sistema respiratório e, por fim, o segundo índice contempla as partículas que possuem diâmetro aerodinâmico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ , que podem penetrar profundamente o sistema respiratório e atingir os alvéolos pulmonares.

No Brasil, o MPA tem grande influência das atividades minero-siderúrgicas. Diversas localidades que abrigam segmentos siderúrgicos relacionados ao processamento de materiais metálicos são próximas às áreas de grande população. Desta forma, a contaminação via partículas atmosféricas tem impacto na população local que pode absorver material diretamente via respiração (CAKMAK et al., 2014; SANTOS; REIS, 2011; SANTOS et al., 2017; VANOS; HEBBERN; CAKMAK, 2014), e nos ecossistemas aquáticos e sua biota.

Indústrias existentes no Estado do Espírito Santo - Brasil, localizadas em uma macrorregião chamada Região Metropolitana da Grande Vitória (RMGV), emitem uma fumaça metálica comumente intitulada como “pó preto” pela população local. O “pó preto”, ou material particulado atmosférico sedimentável (MPAS), gerado a partir das atividades minero-siderúrgicas na cidade de Vitória - ES possui, em sua maior parte, a presença de diferentes tipos de metais/metalóides como: B, Al, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Sn, Ba, La, Ce, Hg e Pb, com o tamanho de partícula podendo ser menor que 100 nm, sendo caracterizada como nanopartícula (SOUZA et al., 2021). A deposição desse MPAS causa problemas para a saúde humana e animal por conter elevadas concentrações de metais pesados (SANTOS et al., 2017), tóxicos para os organismos vivos, levando ao comprometimento da integridade dos ecossistemas impactados. A deposição atmosférica desse material particulado é da

ordem de 16 g/m<sup>2</sup> mensais (SANTOS et al., 2017), resultando em uma deposição diária média em torno de 0,53 g/m<sup>2</sup>. Embora não haja normas e regimentos governamentais que estabeleçam limites seguros dessa deposição no meio aquático, a Resolução CONAMA Nº 491 de 19 de novembro de 2018 estabelece os padrões de qualidade do ar e normatiza que os níveis médios anuais máximos de material particulado devem ser de 40 e 20 µg/m<sup>3</sup> para MP<sub>10</sub> e MP<sub>2,5</sub>, respectivamente. Logo, a quantidade de MPAS que está depositado na RMGV tende a ser superior ao limite estabelecido por lei, visto que a deposição ocorre ao longo de vários anos desde antes do lançamento da presente lei, superando os limites de referência para períodos anuais e diários.

O Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), juntamente com pesquisadores da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Universidade de Córdoba (Argentina), Universidade de Hull (Inglaterra) e da ONG Juntos SOS Ambiental (Vitória – ES, Brasil) tem, desde 2010, desenvolvido estudos nos estuários da região da Grande Vitória (Baía de Vitória) e em Santa Cruz, ES. Nesses estudos, envolvendo plantas e animais nas áreas de manguezais, foi detectada contaminação do ambiente estuarino por metais, além do acúmulo de metais/metalóides (i.g. Fe, Pb, As, Hg, Cr e Cu) em músculo e outros órgãos de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) (SOUZA et al., 2013, 2018) e em diferentes espécies de plantas de manguezais, *Laguncularia racemosa* (SOUZA et al., 2014a), *Rhizophora mangle* (SOUZA et al., 2014b) e *Avicennias schauer* (SOUZA et al., 2015). Em todos esses organismos, o acúmulo de metais foi correlacionado aos metais presentes na água superficial (SOUZA et al., 2013) e o ecossistema de manguezal da Baía de Vitória foi o mais impactado, visto que está próximo da região urbana e das atividades industriais do Complexo de Tubarão (ARRIVABENE et al., 2014, 2015; SOUZA et al., 2014a, 2013, 2014b, 2015).

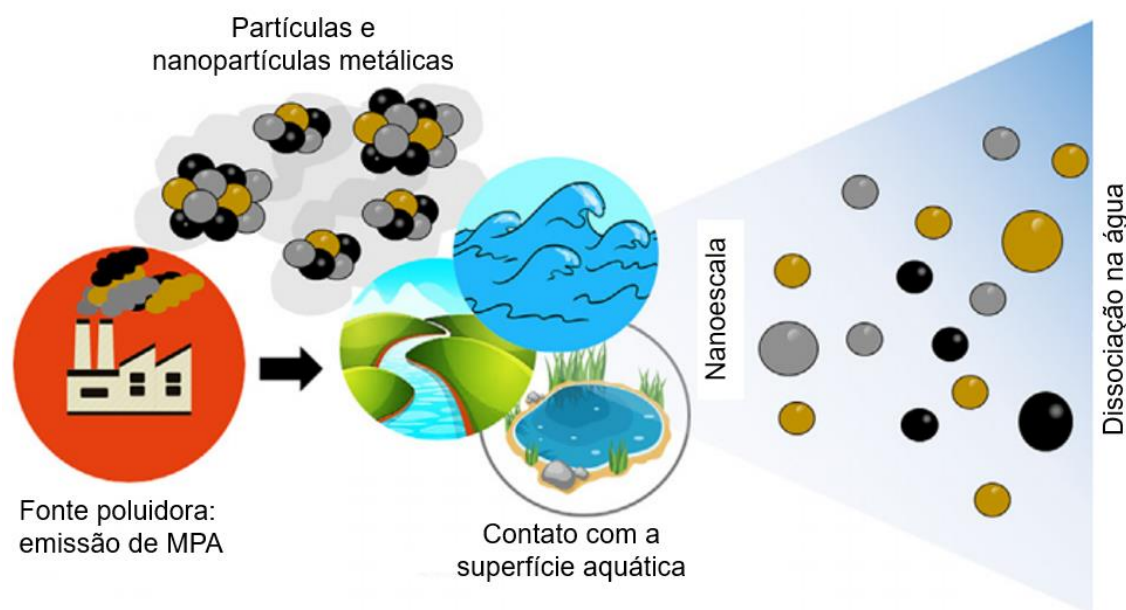
Recentemente, Souza et al. (2018b) estudaram essas duas áreas de estuário utilizando isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}C$ ), nitrogênio ( $\delta^{15}N$ ), estrôncio ( $^{87}Sr/^{86}Sr$ ) e chumbo ( $^{206}Pb/^{207}Pb$  e  $^{208}Pb/^{207}Pb$ ) e determinaram a origem desses metais na cadeia trófica. As análises realizadas indicaram que a fonte de contaminação são metais e nanopartículas metálicas (NP) presentes no MPAS oriundo de atividade minero-siderúrgica, sendo que a transferência destes metais ao longo da cadeia trófica é fortemente influenciada pela água superficial (Figura 1)

contaminada pela deposição desse material particulado (SANTOS; REIS, 2011; SOUZA et al., 2018, 2021b, 2021c).

Além disso, a análise de contaminantes metálicos na biota (plâncton, ostra, caranguejo, camarão e peixe) nos dois estuários e no MPAS revelou a presença de contaminantes metálicos emergentes, ainda não avaliados em programas de monitoramento e, portanto, sem limites pré-estabelecidos na legislação, como bismuto, tungstênio, titânio, zircônio, ítrio, lantânio, nióbio, tântalo e cério (SOUZA et al., 2021b). Tais contaminantes, raros no ambiente e na biota, tem sua origem no MPAS oriundo do complexo minero-siderúrgico (ARRIVABENE et al., 2016) indicando sua utilização como matéria-prima na indústria na produção de novas ligas metálicas empregadas na indústria eletroeletrônica, fabricação de aço de ligas leves e mais resistentes e, em anticorrosivos (SOUZA, 2017). A Figura 1 apresenta um esquema da etapa de emissão até a deposição do MPAS em ambientes aquáticos.

Em estudo recente, de Souza et al. (2021a) demonstraram que o MPAS é dissolvido e posteriormente sedimentado em corpos hídricos. O sedimento contendo MPAS é composto por uma aglomeração de partículas e nanopartículas metálicas, que podem ser dispersas posteriormente na água. A dispersão das nanopartículas metálicas na água, por sua vez, pode aumentar a biodisponibilidade de sólidos suspensos na água, elevando o potencial tóxico desses elementos metálicos e impactando diretamente a biota aquática.

**Figura 1** - Esquema de emissão e deposição do MPAS em sistemas aquáticos



**Fonte:** Souza et al. (2020).

Em outro estudo recente desenvolvido por Fortes (2021), foi avaliado a bioacumulação de metais e nanopartículas metálicas em músculo branco (filé) e vísceras de tilápia-do-Nilo expostas por 30 dias ao MPAS na concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ , assim como foi determinada a concentração de metais em amostras de MPAS e de água. Foi observado que o MPAS possui cerca de 30 elementos metálicos, sendo que o cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), titânio (Ti), alumínio (Al) e ferro (Fe-56 e Fe-57) estão presentes em maior concentração no pó preto. O autor selecionou os metais cobre, zinco, manganês, ferro, chumbo e alumínio (com base na concentração elevada e por terem limites estabelecidos pela legislação CONAMA) e verificou que ocorre bioacumulação destes metais em músculo branco e, principalmente, nas vísceras de tilápia-do-Nilo. O autor identificou que em amostras de água a concentração destes metais foi maior entre os dias 0 e 6, passando por uma redução progressiva até atingir os dias finais de exposição (dia 30, exposição crônica). Em diversos dias de exposição, principalmente entre os dias 0 e 6, os limites estabelecidos pela legislação Conama nº 357/05 de 2005 foram ultrapassados, indicando uma concentração expressiva de metais na água em decorrência da presença do MPAS.

Pelas razões supracitadas, tornam-se evidentes a urgência, a necessidade e a importância de estudos que avaliem não somente a biodisponibilidade desses contaminantes metálicos como também seus mecanismos de ação e efeitos no

desempenho dos organismos expostos, em particular em peixes, que são abundantes recursos alimentares para a população.

## **1.2 Biomarcadores de estresse em peixes**

Os peixes enfrentam vários desafios, desde a variação dos aspectos físico-químicos da água, competição por recursos, até o domínio de um indivíduo sobre a população, entre outros (BARTON, 1988). Além desses fatores, os peixes estão mais vulneráveis a contaminação que ocorre nos ambientes aquáticos, incluindo metais e metais pesados, constituindo uma fonte de estresse para os organismos aquáticos (KORI-SIAKPERE; UBOGU, 2008). O estresse pode ser definido como uma situação de desequilíbrio do organismo, em que a homeostase é alterada, resultante da ação de estímulos intrínsecos chamados de estressores (WANDEELAR-BONGA, 1997). Wedemeyer et al (1990) diz que as adaptações feitas pelos peixes para assegurarem sua sobrevivência refletem em mudanças fisiológicas, hematológicas e imunológicas em resposta aos agentes estressores. A contaminação por metais e metais pesados pode interferir nas funções do sistema endócrino de peixes, incluindo os teleósteos (OLIVEIRA et al., 2008).

As respostas ao estresse são classificadas em primária, secundária e terciária (WEDEMEYER; MCLEAY, 1981). As respostas primárias são hormonais, as secundárias são mudanças fisiológicas e bioquímicas e as terciárias são prejuízos do crescimento do indivíduo e aumento da ocorrência de doenças. Um dos indicadores mais utilizados para avaliar o estresse em peixes são o cortisol plasmático e a glicose, primário e secundário, respectivamente (BARTON, 2000).

A elevação dos níveis de cortisol e glicose plasmática indicam, portanto, uma condição de estresse e refletem a necessidade de energia para suportar a situação adversa. De acordo com Mommsen et al (1999), essa elevação tem origem glicogenolítica proveniente da ação de corticosteróides e catecolaminas, também sendo indicadores de estresse em peixes. Na tentativa de suprir a alta demanda por energia, as altas concentrações de cortisol podem resultar em hiperglicemia durante a situação de estresse (IWAMA, 1998).

Outro parâmetro que evidencia a demanda por energia em situação de estresse é a concentração de hemoglobina, logo, a concentração de hemoglobina se torna uma resposta secundária e que reflete a capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue (HOUSTON, 1997). A hematologia é uma ferramenta útil no diagnóstico de

perturbações homeostáticas em peixes (DE PAIVA et al., 2013). A avaliação hematológica auxilia a compreensão dos efeitos de produtos tóxicos na água, além de ser útil para monitorar a saúde de peixes (CLAUSS et al., 2008). A hemoglobina possui a função de transportar o oxigênio das brânquias até os demais tecidos e, qualquer prejuízo em sua quantidade ou funcionalidade pode comprometer a oxigenação dos tecidos (RANZANI-PAIVA et al., 2004).

### **1.3 Biomarcadores de estresse oxidativo**

A deposição aquática do MPAS causa contaminação dos ambientes hídricos com metais dos diversos tipos e em diferentes concentrações (SOUZA et al., 2018). A contaminação por metais e metaloides, por sua vez, é um dos principais responsáveis pelo estresse oxidativo em peixes (LIVINGSTONE, 2003). Esse processo ocorre devido a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que reagem com macromoléculas, levando a perda das funções celulares.

O conjunto de sistemas de defesa das células são os enzimáticos (Superóxido dismutase - SOD, Catalase - CAT, Glutathione peroxidase - GPx, Glutathione S-transferase - GST, Glutathione reductase - GR) e os não-enzimáticos (Glutathione reduzida - GSH, Metalotioneína - MT) e possuem o objetivo de proteger as células e manter seu estado redox. Em condições fisiológicas normais, os efeitos danosos das ERO são neutralizados pelo sistema de defesa antioxidante (DANDAPAT, 2000). Os antioxidantes são responsáveis pela inibição ou redução de lesões ocasionadas pelas ERO nas células (CERUTTI, 1994). Dentre os principais mecanismos de lesão oxidativa, vale ressaltar a lipoperoxidação (LPO) e a carbonilação de proteínas (PC), que são frutos da oxidação de lipídeos e proteínas, respectivamente, e que conduzem a perda de estrutura e função dessas macromoléculas (HOGG; KALYANARAMAN, 1998).

A perda do equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a atividade do sistema antioxidante de defesa caracteriza o estresse oxidativo. Logo, a redução dos sistemas antioxidantes e/ou o excesso de produção de ERO resulta em células frágeis e sujeitas aos danos oxidativos de suas macromoléculas, capazes de induzir a morte celular (BIESALSKI, 2000), aumentando a vulnerabilidade e a capacidade de resposta das células frente a desafios. Os danos oxidativos se estendem aos componentes celulares como lipídios, proteínas e o próprio DNA (NORDBERG; ARNER, 2001) e são frequentemente associados às condições patológicas. Na tentativa de interagir



com as biomoléculas celulares, as ERO danificam as estruturas celulares e, ao oxidá-las, podem resultar em perda total ou parcial das suas funções. A avaliação de mudanças bioquímicas causadas pelas ERO contribui para um monitoramento dos efeitos de determinados poluentes a nível de indivíduos (VALAVANADIS et al., 2005).

#### **1.4 Biomarcadores fisiológicos**

O estudo *ex vivo* do funcionamento do músculo cardíaco isolado permite a avaliação da performance e da capacidade contrátil do coração, fornecendo importantes parâmetros da função cardíaca, incluindo a força de contração, taxas de contração e relaxamento, além do índice de capacidade de bombeamento cardíaco, estreitamente relacionado ao débito cardíaco do animal.

Semelhante aos demais vertebrados, o coração de peixes teleósteos é o órgão central do sistema circulatório responsável por gerar o bombeamento de sangue, transportando nutrientes e oxigênio para os demais tecidos. A principal característica do coração de vertebrados é a capacidade de manter seu desempenho frente a condições fisiológicas variáveis (DRIEDZIC; GESSER, 1994). Em animais ectotérmicos, o coração está sujeito a variações maiores em concentrações de gases, no equilíbrio ácido-base e na temperatura, quando comparados aos vertebrados endotérmicos. Essas características ocorrem devido às flutuações ambientais, súbitas e imprevisíveis, a que estes animais estão sujeitos (DRIEDZIC; GESSER, 1994).

O músculo cardíaco de peixes teleósteos situa-se alojado dentro do saco pericárdico, sendo constituído por 4 câmaras em série, que bombeiam sangue venoso: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso. Funcionando de maneira conjunta, essas 4 câmaras potencializam a energia e cinética do sangue (FARREL; JONES, 1992).

As células musculares cardíacas de peixes e mamíferos diferem-se em relação ao: a) tamanho reduzido em peixes; b) desenvolvimento limitado do retículo sarcoplasmático; c) arranjo periférico das miofibrilas; d) conteúdo variável de mioglobina intracelular (FARREL; JONES, 1992; TIBBITS et al., 1991). Uma importante vantagem funcional conferida por um miócito reduzido é a maior razão entre a área superficial da sarcolema e o volume intracelular, tendo uma menor distância do exterior para o interior da célula, essencial para a troca de substâncias

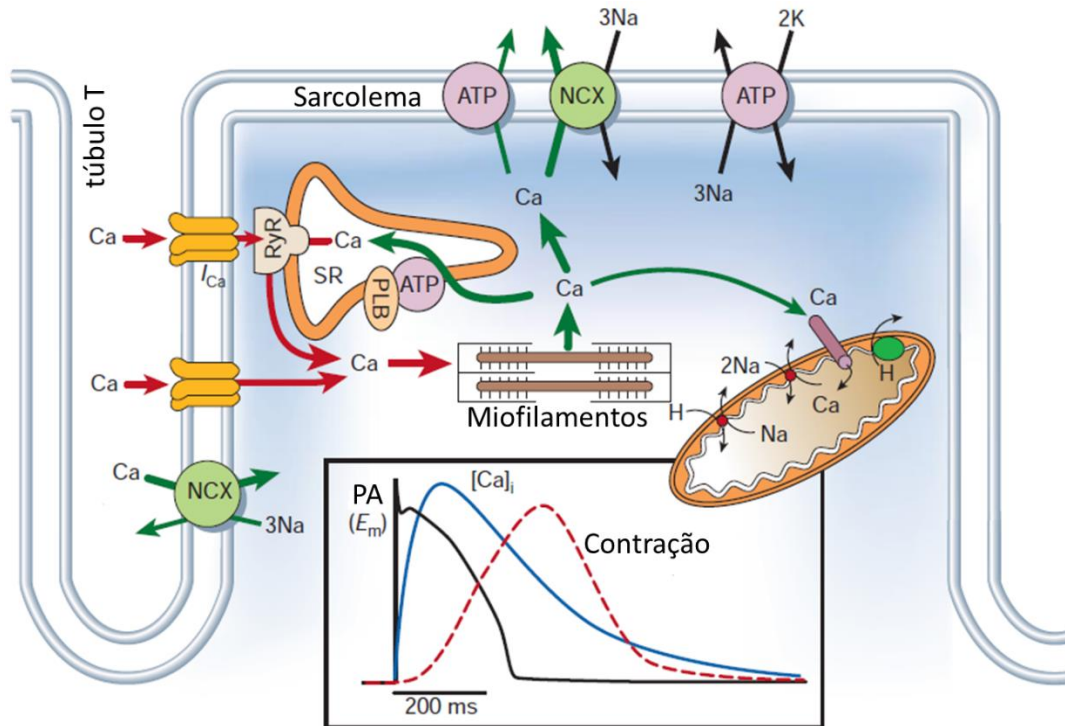
como o cálcio entre espaços intra e extracelulares (DRIEDZIC; GESSER, 1994; VORNANEN, 1997).

Diferentemente do que observado em ectotérmicos, em mamíferos ocorre a presença de túbulos-T, que são invaginações da sarcolema e que colaboram na propagação do potencial de ação para o interior da célula e reduz a distância de difusão do cálcio do meio extracelular para o meio intracelular e vice-versa. Bers (1991) diz que os túbulos-T correspondem de 30% a 50% da área sarcolemal ventricular nos mamíferos.

O retículo sarcoplasmático (RS) é outra característica que difere entre os cardiomiócitos de peixes e mamíferos, tanto na abundância e distribuição quanto na sua própria funcionalidade. O RS é uma organela especializada no armazenamento e liberação de cálcio para o mecanismo de contração muscular, imprescindível para a ativação do aparelho contrátil, principalmente em aves e mamíferos, onde o RS é bem desenvolvido (CHAPMAN, 1983; BERS, 1987, 1989, 1991, 2001; GWATHMEY; MORGAN, 1991). Mas, o desenvolvimento do RS é variado entre as espécies de vertebrados ectotérmicos, sendo que na maioria dos peixes o RS é pouco desenvolvido e seu papel na contração do miocárdio pode não ser funcional (AHO; VORNANEN, 1998; DRIEDZIC; GESSER, 1998; SHIELS; FARREL, 1997).

O acoplamento excitação-contração (acoplamento E-C), apresentado na figura 2, corresponde à sequência de eventos que ocorre desde a despolarização do miócito até a contração e relaxamento muscular. A geração de força e a frequência cardíaca dependem da quantidade de cálcio que interage com as proteínas contráteis, assim como o tempo em que o cálcio permanece disponível no citosol para tal interação (YUE, 1987). A diferença mais notável entre ectotérmicos e endotérmicos está relacionada com a origem do cálcio utilizado pelas miofibrilas (TIBBITS et al., 1992).

**Figura 2 - Acoplamento excitação-contração de mamíferos**



Esquema geral do mecanismo de acoplamento E-C do músculo cardíaco de mamíferos. Setas representam as vias de entrada e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  no sarcoplasma. SR: retículo sarcoplasmático; RyR: canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (canal de rianodina); NCX: trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ ; SERCA: Ca. **Fonte:** Adaptado de Bers (2002).

A origem do cálcio responsável pela interação actino-miosínica ( $\text{Ca}^{2+}$  ativador) advém de duas fontes: o meio extracelular, pelos canais voltagem-dependentes do tipo L (canais lentos) presentes na sarcolema e pelo trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) no modo reverso; o retículo sarcoplasmático (RS), uma reserva interna de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Na maioria dos peixes, incluindo a da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), o RS parece não ser funcional, devido à sua insensibilidade à rianodina, mostrando que o cálcio extracelular é o principal mecanismo de ativação da contração (TIBBITS et al., 1992; VORNANEN, 1997; TREWAVAS, 1982). Por outro lado, alguns teleósteos conseguem utilizar parte do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (depositados no RS), como por exemplo o curimatá, *Prochilodus lineatus*, e a traíra, *Hoplias malabaricus* (RIVAROLI et al., 2006). O processo de relaxamento muscular em peixes teleósteos com o RS pouco desenvolvido, como o caso da tilápia-do-Nilo, é atribuído à saída do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por ação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal e, principalmente pela ação do NCX atuando em seu modo normal (VORNANEN et al., 2002).

Assim, entender o funcionamento dos mecanismos do acoplamento E-C (Figura 2) também colabora para entender as estratégias utilizadas para se manter o débito cardíaco apropriado em determinadas espécies (BERS, 1991). O débito cardíaco é o produto da frequência cardíaca e do volume sistólico, e deve ser regulado para que o fluxo sanguíneo seja adequado às condições impostas pelo ambiente, principalmente em ectotérmicos, em que sua regulação de temperatura depende das oscilações ambientais.

A exposição de organismos a diferentes tipos de poluentes pode alterar de diferentes formas os mecanismos descritos acima e causar diversas respostas cardíacas de acordo com a espécie. Tort e Madsen (1991) reportaram o bloqueio dos canais de cálcio do músculo cardíaco de *Squalus acanthias* expostos a cádmio e zinco, causando uma redução na taxa de contração. Por outro lado, Milligan e Wood (1982) constataram incrementos na taxa de contração e de pressão sanguínea em trutas expostas por períodos prolongados em águas com pH 4-4,5, causando estresse nos animais. Os autores constataram que o estresse induziu a liberação de catecolaminas a partir dos nervos autônomos, provocando as respostas cardíacas.

A utilização de índices organo-somáticos, por sua vez, contribui para avaliar o bem-estar do peixe em relação a condições alimentares e a influência de fatores ambientais sobre o animal (VAZZOLER, 1996). São índices interessantes ao se comparar indivíduos da mesma espécie ou de espécies similares, como é o caso apresentado por Norris et al (2000), em que peixes contaminados por metais apresentam um índice hepatossomático menor do que peixes de ambientes não contaminados.

A massa ventricular relativa é um índice importante para avaliação de danos estruturais e funcionais no coração. Bartolome et al (1982), por exemplo, observou mudanças no peso do coração de ratos expostos ao mercúrio orgânico e inorgânico. É possível observar hipertrofia cardíaca em animais expostos a poluentes, muitas vezes relacionado à necessidade de aumento da performance cardíaca. Outro índice muito utilizado para avaliar a saúde de animais e, principalmente comparar animais de ambientes degradados com ambientes não degradados, é o fator de condição (LIMA-JUNIOR; GOITEIN, 2002). Por utilizar o peso do animal e o comprimento total, assume-se que animais de ambientes não degradados apresentem um peso e comprimento maior, devido as condições favoráveis.

### 1.5 Considerações sobre a espécie estudada

As tilápias são originárias da África e Ásia e foram introduzidas no Brasil a partir da década de 70 (PINHEIRO et al., 2006). É uma espécie capaz de ser produzida e cultivada tanto em clima tropical como subtropical (MORO et al., 2013). O processo de criação de tilápias é chamado de tilapicultura e, atualmente, é uma ótima alternativa para a piscicultura de água doce e estuarina (THOMAZ, 2008). Meurer et al. (2003) destaca que a rápida expansão da tilapicultura é resultado do ótimo desempenho, elevada rusticidade, facilidade na obtenção e manejo de alevinos, plasticidade frente aos diversos sistemas de criação, aceitação no mercado de lazer e alimentício, além da qualidade nutritiva e organoléptica de seu filé. Tais características permitem que o grupo das tilápias, que compreende espécies do gênero *Oreochromis* e *Tilapia*, em especial a espécie *Oreochromis niloticus*, seja uma das espécies mais cultivadas no mundo, sendo resistentes à altas temperaturas, baixas concentrações de oxigênio dissolvido e altas concentrações de amônia na água (BOSCOLO et al., 2001).

De acordo com Popma e Masser (1999), a tilápia-do-Nilo é lateralmente comprimida, com uma longa nadadeira dorsal, sendo a parte anterior espinhada. A pélvis e a nadadeira anal também possuem espinhos (Figura 3). Essa espécie constrói ninhos e os ovos fertilizados são incubados na boca.

Segundo Trewavas (1982), a tilápia-do-Nilo ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: TELEOSTEI

Ordem: PERCIFORMES

Família: CICHLIDAE

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758)

**Figura 3** - Foto de um exemplar de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*



Exemplar de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Fonte:** autor.

No entanto, apesar dos benefícios econômicos e alimentícios propiciados pela espécie, existem impactos negativos em relação à introdução de tilápias no ambiente. É importante avaliar os impactos ecológicos que podem ocorrer devido a presença da tilápia em diferentes tipos de habitats. Attayde et al (2011), por exemplo, verificou que a introdução de tilápias em um reservatório tropical chamado Gargalheiras, localizado na cidade de Acari, na região semi-árida do Rio Grande do Norte, apresentou benefícios socioeconômicos superestimados em relação a introdução da tilápia. As mesmas características que tornam a tilápia um peixe de relevante interesse comercial, abrem brechas para que esta espécie invada o território de espécies nativas, com grande potencial em se tornar uma praga e de se tornar uma ameaça para espécies nativas (ATTAYDE, 2007).

Diante das informações citadas acima, a tilápia-do-Nilo apresenta boas condições para se tornar um modelo experimental neste cenário. De acordo com um Relatório de Impacto Ambiental (RIMA) realizado no ano de 2009 na área industrial do Complexo do Tubarão, localizada nos municípios de Serra e Vitória, Espírito Santo, Brasil, foram identificadas a presença de ao menos 4 espécies exóticas, como a *Poecilia reticulata*, *Hoplosternum littorale*, *Tilapia rendalli* e *Oreochromis niloticus*. A presença de espécies resistentes na área indica que a região é fortemente impactada de maneira negativa pelas alterações ambientais que ocorrem no local. As lagoas do

Complexo do Tubarão possuem interligações e facilitam a dispersão das espécies, que pode resultar em maior ocorrência da tilápia em outros pontos.

Após as informações detalhadas a respeito do MPAS, dos biomarcadores fisiológicos e das considerações sobre a espécie estudada, a hipótese deste trabalho foi: a exposição aguda ao MPAS é capaz de alterar a função cardíaca de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar os efeitos de exposições agudas ao material particulado atmosférico sedimentável (MPAS) proveniente da atividade siderúrgica (“pó preto”) sobre biomarcadores bioquímicos e fisiológicos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os peixes foram expostos por 96 horas ao MPAS dissolvido na água, nas concentrações de 0,01 g.L<sup>-1</sup>, 0,1 g.L<sup>-1</sup> e 1,0 g.L<sup>-1</sup> e os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

**A)** Determinar as respostas inotrópicas (desenvolvimento do pico de força de contração isométrica) e cronotrópicas (tempo para o desenvolvimento do pico de tensão, tempo para 50% do relaxamento e taxas de contração e relaxamento) das tiras ventriculares isoladas e estimuladas eletricamente a 0,2 Hz ou 12 bpm durante 30 minutos e comparar os resultados obtidos nos animais controles e expostos ao “pó preto”.

**B)** Avaliar os efeitos do aumento da taxa de estimulação elétrica sobre a força de contração do miocárdio ventricular e sobre os parâmetros tempo-dependentes, tanto nos animais controle quanto nos intoxicados, avaliando o acoplamento excitação-contração numa ampla faixa de frequência, passando por frequências fisiologicamente relevantes, observadas *in vivo*.

**C)** Analisar os efeitos de pausas de 10, 30, 60 e 300 segundos na estimulação elétrica sobre o desenvolvimento de força (% dos valores obtidos antes da pausa) das tiras ventriculares das tilápias dos grupos controle e expostos ao MPAS.

**D)** Avaliar os efeitos do “pó preto” no índice de capacidade de bombeamento cardíaco (CBC) da espécie.

A partir dessa avaliação da contratilidade miocárdica *ex vivo* foi, então, realizada a escolha da concentração realística de MPAS que apresentou os efeitos

mais pronunciados e evidentes na performance cardíaca da tilápia-do-Nilo. Essa concentração foi a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS. A partir disso, objetivou-se especificamente:

**E)** Determinar e quantificar os metais presentes no MPAS e a biodisponibilidade de seus constituintes no meio aquoso.

**F)** Obter os índices organo-somáticos: índice hepatossomático (IHS), massa ventricular relativa (MVR) e fator de condição (K) que são indicadores do bem-estar e saúde refletindo estado geral do indivíduo.

**G)** Determinar o conteúdo de hemoglobina (Hb) no sangue das tilápias-do-Nilo como indicador da capacidade do sangue em transportar oxigênio aos tecidos.

**H)** Quantificar os níveis plasmáticos de cortisol, glicose e proteínas plasmáticas totais, comumente utilizados como indicadores para a avaliação da condição de estresse em peixes.

**I)** Analisar os biomarcadores de estresse oxidativo como o conteúdo do antioxidante não-enzimático glutathiona reduzida (GSH) no sangue total e no coração, além dos níveis de lipoperoxidação (LPO) e de proteínas carboniladas (PC) no plasma e no coração das tilápias dos diferentes grupos.

**J)** Avaliar a expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX1) no ventrículo das tilápias controles e expostas a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aprovação do comitê de ética e uso de animais (CEUA)**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (nº 8105110718).

#### **3.2 Coleta e tratamento do Material Particulado Atmosférico Sedimentável (MPAS)**

As amostras de MPAS foram coletadas na Ilha do Boi (Figura 4), localizada à aproximadamente 14 km do Complexo do Tubarão, em Vitória, Espírito Santo, Brasil ( $20^\circ 17' 03.8'' \text{ S}$ ,  $40^\circ 14' 24.9'' \text{ W}$ ). A Ilha do Boi é uma ilha que possui apenas tráfego local e, conseqüentemente, baixo nível de contaminação por fontes de poluição móveis. No entanto, a ilha recebe diretamente a poluição por MPA emitido no Complexo do Tubarão (Figuras 5 e 6), devido à alta taxa de atividade minero-



siderúrgica do local, incluindo atividades como pelotização, estocagem e transporte de minério de ferro, além da produção de aço em diferentes ligas metálicas, emitindo o MPA que se deposita por toda região (SANTOS et al., 2017). As figuras 7 e 8 mostram o acúmulo do MPAS em diferentes locais e a figura 9 mostra o MPAS na forma bruta, sem peneiramento.

**Figura 4** - Localização do Complexo do Tubarão e da Ilha do Boi, Vitória - ES



Localização do Complexo do Tubarão e do ponto de coleta das amostras de MPAS na Ilha do Boi, Vitória, Espírito Santo - ES, Brasil. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As coletas do MPAS foram realizadas em março de 2018, com contêineres situados 20 m acima do chão na Ilha do Boi. A duração da coleta foi de 30 dias consecutivos (5 g - 8 g.m<sup>-2</sup> em uma área de 5000 m<sup>2</sup>) resultando em 6 amostras, cada uma em 5 dias (SOUZA et al., 2021a). O material foi coletado pela ONG Juntos SOS Ambiental, mantido em recipientes plásticos em temperatura ambiente (SOUZA et al., 2021a) e posteriormente foram enviados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), UFSCar.

**Figura 5** - Foto panorâmica do complexo do Tubarão e emissão de fumaça



Foto panorâmica do complexo minero-siderúrgico da cidade de Vitória, o Complexo do Tubarão. **Fonte:** ONG Juntos SOS Ambiental.

**Figura 6** - Foto panorâmica do complexo do Tubarão e pontos de emissão do pó preto



Foto panorâmica do complexo minero-siderúrgico da cidade de Vitória, o Complexo do Tubarão. Na imagem é possível observar alguns pontos de emissão do MPAS que contribuem com a poluição da região. **Fonte:** ONG Juntos SOS Ambiental.

**Figura 7** - Foto do acúmulo de pó preto em uma residência de Vitória – ES



Acúmulo do MPAS em uma residência da região de Vitória. **Fonte:** ONG Juntos SOS Ambiental.

**Figura 8** - Foto do acúmulo de pó preto em papel



Acúmulo do pó preto em papel toalha em uma residência de Vitória – ES. **Fonte:** ONG Juntos SOS Ambiental.



**Figura 9** - Foto do pó preto (MPAS) bruto



Material bruto coletado pela ONG Juntos SOS Ambiental, com partículas agregadas e desagregadas.  
**Fonte:** ONG Juntos SOS Ambiental.

### 3.3 Delineamento experimental

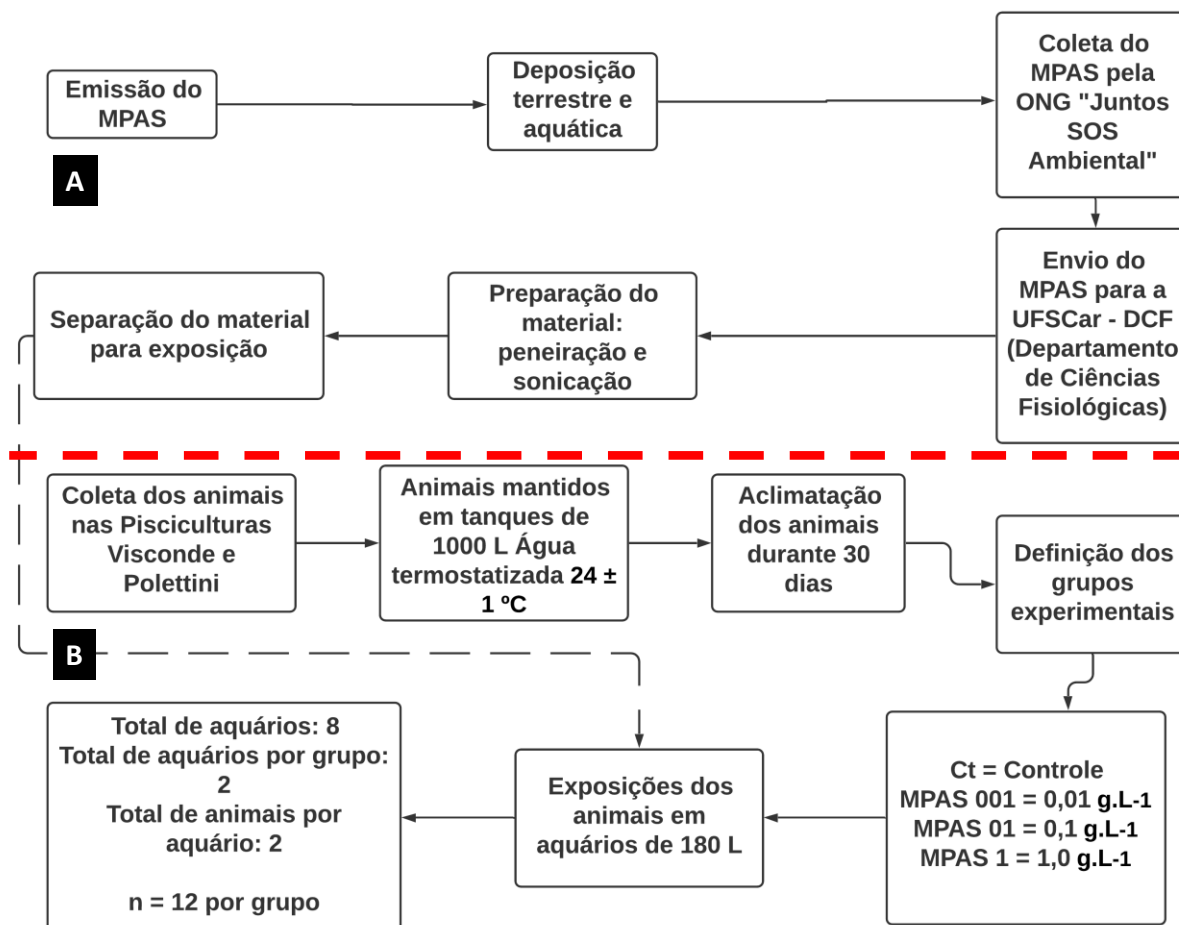
Exemplares juvenis de ambos os sexos de tilápia-do-Nilo, *O. niloticus* (massa =  $69 \text{ g} \pm 3.6$ , comprimento =  $15.6 \text{ cm} \pm 0.24$ , média  $\pm$  EPM) foram gentilmente cedidos pela piscicultura Visconde, de São Carlos - SP e pela piscicultura Polettini de Mogi-Mirim - SP. Em seguida, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas - UFSCar, para aclimatarem às condições laboratoriais e realização dos experimentos.

Os peixes foram mantidos em tanques com capacidade de 500 e 1000 L, dotados de recirculação contínua de água termostaticada, aeração constante e temperatura controlada ( $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), durante um período de pelo menos 30 dias para a recuperação do estresse decorrente da coleta, transporte e aclimação. Os peixes foram alimentados duas vezes a cada semana com ração comercial da marca Acqua Line<sup>®</sup>, composta por 32% de proteína e com tamanho médio de 5 mm, de maneira *ad libitum*. A alimentação dos animais foi cessada 48 horas antes das exposições.

As tilápias foram divididas em 4 grupos experimentais: Grupo Ct (controle, ou seja, água livre de "pó preto",  $n = 10$ ), grupo MPAS 001 (peixes expostos por 96 horas a  $0,01 \text{ g.L}^{-1}$  de "pó preto",  $n = 10$ ), grupo MPAS 01 (peixes expostos por 96 horas a  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de "pó preto",  $n = 10$ ) e grupo MPAS 1 (peixes expostos por 96 horas a  $1,0$

g.L<sup>-1</sup> de “pó preto”, n = 10). A figura 10 exhibe as etapas de coleta do MPAS e dos exemplares de tilápia.

**Figura 10** - Fluxograma da coleta do MPAS e dos exemplares de tilápia-do-Nilo



Fluxograma geral das etapas contidas no delineamento experimental. **A)** panorama geral da coleta, transporte, separação e preparação do MPAS. **B)** panorama geral da coleta, transporte, aclimação e exposição dos peixes ao MPAS. As etapas descritas nesse fluxograma são de caráter geral, sendo exploradas e detalhadas em tópicos seguintes. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As exposições foram realizadas em aquários de 180 L, não excedendo o limite de 1,0 g.L<sup>-1</sup> da relação peixe/água estabelecido pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) “Guideline for testing of chemicals” (2014). Dessa forma, as exposições foram realizadas com, no máximo, 2 peixes por aquário. O período de experimentos foi realizado durante o verão de 2019. A temperatura dos aquários foi mantida em 25 °C em sistema semi-estático, em que 1/3 da água dos aquários experimentais foi renovada a cada 48 horas para manter os parâmetros físico-químicos de qualidade de água, além de manter os níveis do MPAS. O “pó preto” foi adicionado em uma quantidade de água retirada dos próprios aquários em um

recipiente reservado. Após esse procedimento, o recipiente passou pelo processo de sonicação em banho de ultrassom por 30 minutos, sendo finalmente despejado por completo nos aquários experimentais para o início das exposições.

As concentrações de MPAS foram definidas com base nos cálculos de deposição diária/mensal que ocorre na Região Metropolitana da Grande Vitória (ES). Santos et al. (2017) verificaram que as maiores taxas de deposição do MPAS foram 16 g/m<sup>2</sup> e 14 g/m<sup>2</sup> mensais, resultando em aproximadamente 0,5 g/m<sup>2</sup> diários. De acordo com informações públicas constadas no site do IEMA (Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos), a deposição média diária de pó preto pode apresentar picos diários superiores a 1,0 g/m<sup>2</sup> por dia. A partir dessa informação, foram selecionadas as três concentrações avaliadas no presente trabalho, sendo a mais baixa concentração (MPAS 001, grupo exposto a 0,01 g.L<sup>-1</sup> de MPAS), grupo de média concentração (MPAS 01, grupo exposto a 0,1 g.L<sup>-1</sup> de MPAS) e grupo de alta concentração (MPAS 1, grupo exposto a 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS).

### **3.4 Determinação das características físico-químicas da água**

As medições das variáveis físico-químicas da água foram realizadas em todos os grupos experimentais. As medições foram feitas diariamente e no mesmo horário, para evitar possíveis alterações.

#### **3.4.1. Temperatura, pH e condutividade**

Os valores de pH, temperatura e condutividade foram medidos com o aparelho multiparâmetro (Figura 11) Orion Star™ A329 (ThermoFisher Scientific Inc.) previamente calibrado antes das medições diárias. O pH e temperatura foram medidos utilizando a mesma sonda de detecção, enquanto a condutividade foi medida com sua sonda específica. A medição dessas variáveis foi realizada por meio do mergulhamento de suas respectivas sondas nos aquários experimentais por um período suficiente para que a medição se tornasse precisa.

**Figura 11** - Sonda multiparâmetro Orion Star™ A329



Sonda multiparâmetro Orion Star™ A329 (ThermoFisher Scientific Inc.) utilizado nas medições de pH, temperatura e condutividade da água. **Fonte:** autor.

### 3.4.2. Oxigênio dissolvido na água

Os níveis de oxigênio dissolvido foram medidos com o aparelho Fibox 3 Mini Sensor Oxygen Meter (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Alemanha), que fornece medições precisas através de fibra óptica. Conectado a um computador, o Fibox 3 (Figura 12) acompanhado de seu software permitiu a medição e leitura do oxigênio dissolvido nas amostras de água dos aquários experimentais.

**Figura 12 - Fibox 3 Mini Sensor Oxygen Meter**



Fibox 3 Mini Sensor Oxygen Meter (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Alemanha), utilizado nas medições do nível de oxigênio dissolvido na água. **Fonte:** autor.

### 3.4.3 Concentração de amônia na água

As concentrações de amônia foram determinadas com o reagente Nessler (GREENBERG et al., 1976). A solução padrão de amônia foi preparada com 4 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl. A partir da solução padrão de amônia, outras soluções padrões foram feitas partindo de diluições de 50% da solução padrão (4 mg.L<sup>-1</sup>), resultando em concentrações de 2 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 0,25 mg.L<sup>-1</sup>. Foram pipetados 1 ml das amostras, 1 ml das soluções-padrão e 1 mL de água destilada (branco) em tubos de ensaio. Em seguida, 200 µL do reagente Nessler (Imbralab Química e Farmacêutica Ltda., Ribeirão Preto - SP) foram pipetados em todos os tubos de ensaio e, posteriormente, os tubos foram agitados em vortex. Após 30 minutos de repouso, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a  $\lambda = 425$  nm. Valores de amônia foram expressos em mg.L<sup>-1</sup> e estimados a partir da curva padrão feita com cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl).

### 3.4.4 Alcalinidade

A alcalinidade foi medida pelo método volumétrico de acordo com as técnicas descritas por Golterman e Climo (1969). Amostras de 100 ml de água foram coletadas dos aquários para determinação do valor de pH. Para determinar a alcalinidade, utilizou-se ácido sulfúrico 0,01 N como indicador para a titulação até o pH 4,0.



Para calcular a alcalinidade das amostras, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Alcalinidade} = \frac{V1 * N * Eq}{Va}$$

Onde:

V1: volume do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado para titular a amostra até pH 4,0;

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

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

Va: volume da amostra.

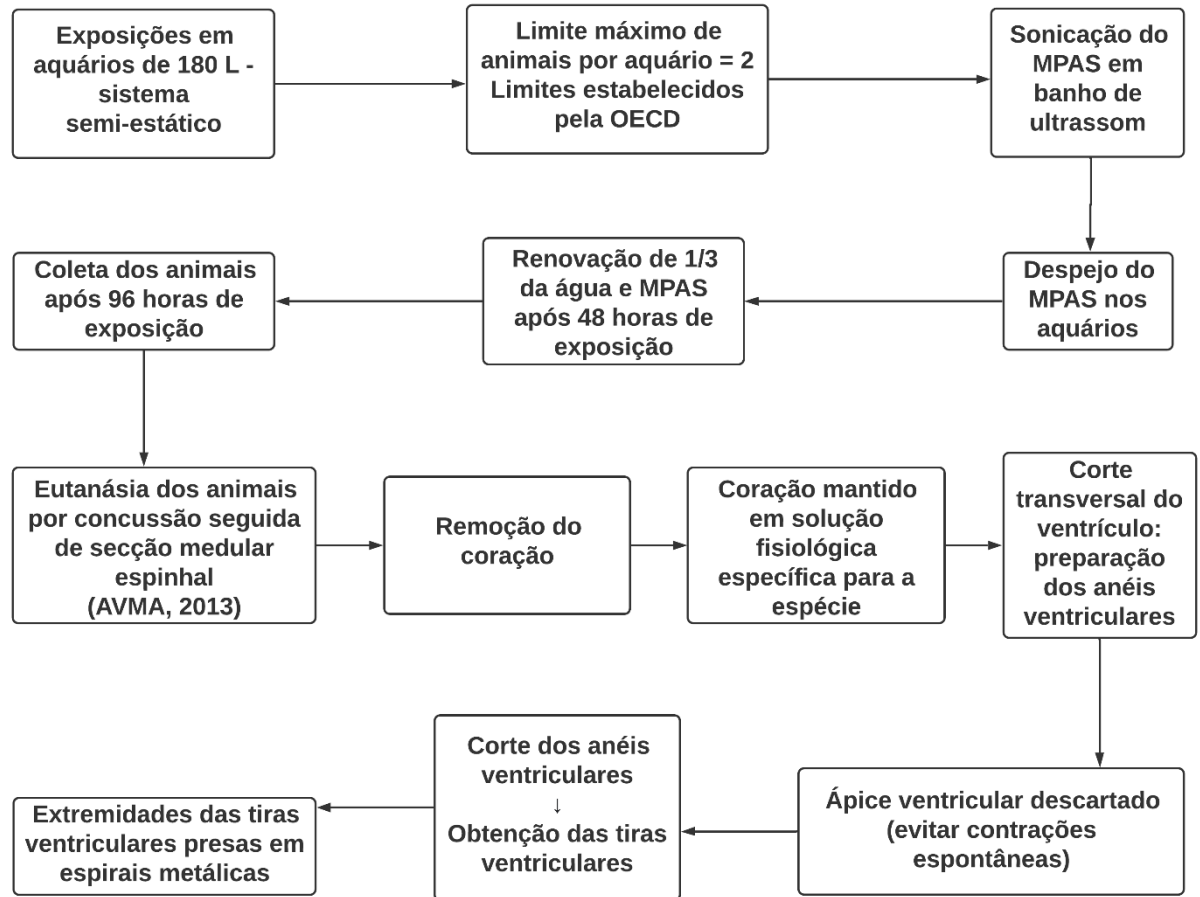
### 3.5 Estudo da contratilidade miocárdica *ex vivo*

Os animais dos distintos grupos experimentais foram eutanasiados por concussão seguida de secção da medula espinhal em conformidade com as normas da “*American Veterinary Medical Association*” (AVMA, 2013) e com a Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA, uma vez que qualquer anestésico empregado interfere na função cardíaca, induzindo inotropismo negativo pela inibição dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L e redução do Ca<sup>2+</sup> transiente (HANLEY et al., 2004).

As preparações experimentais foram efetuadas de acordo com os procedimentos adotados por Monteiro et al (2017). Após a eutanásia, os corações foram removidos cirurgicamente e colocados em solução fisiológica própria para a espécie, composta por (mM): 100,0 de NaCl, 5,0 de KCl, 1,2 de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,0 de NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub> e 10 de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, pH 7,2.

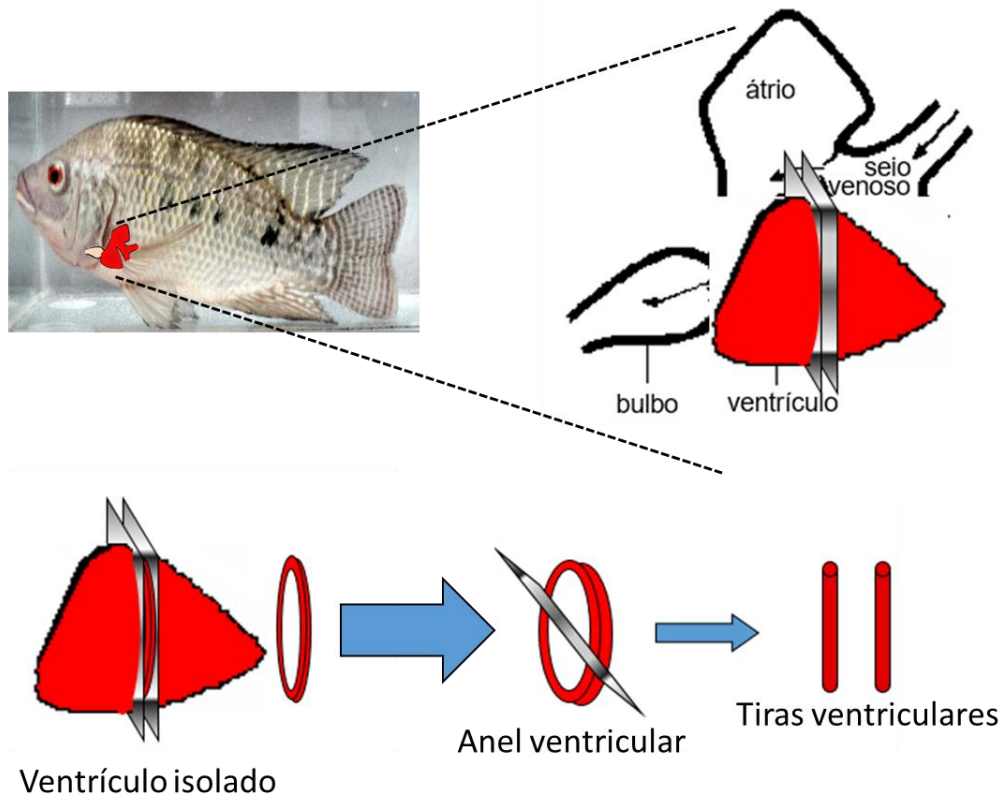
Em seguida, foram preparados anéis ventriculares de largura de aproximadamente 3-4 mm através do corte transversal do ventrículo. O ápice do ventrículo foi desprezado para diminuir a probabilidade de ocorrência de contrações espontâneas das preparações no decorrer dos experimentos. Os anéis ventriculares foram então cortados ao meio para a obtenção de pares de tiras ventriculares (Figura 14) contendo camadas compactas e esponjosas (massa = 0,0014 g ± 0,0001, comprimento = 0,1230 cm ± 0,0147, média ± EPM). A figura 13 exibe um fluxograma desde a etapa de exposição até o preparo das tiras ventriculares.

**Figura 13** - Fluxograma de exposição e preparo das tiras ventriculares



Fluxograma contendo o início das exposições até o momento do preparo das tiras ventriculares. **Fonte:** elaborado pelo autor.

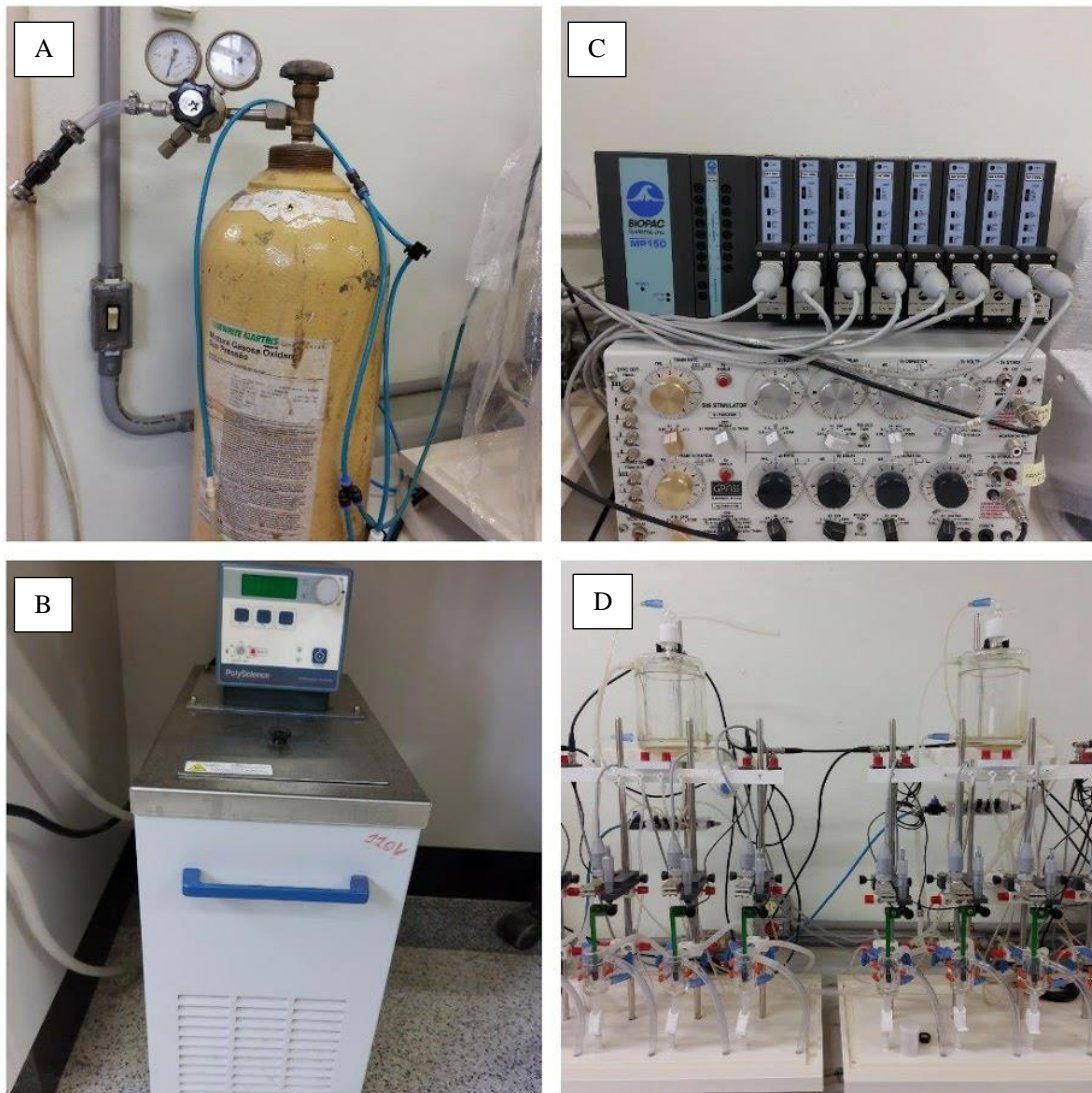
**Figura 14 - Remoção do coração e preparação das tiras ventriculares**



Preparação das tiras ventriculares de tilápia, *O. niloticus*. Remoção do coração do animal, remoção do átrio e bulbo arterioso, cortes transversais no ventrículo e preparo das tiras ventriculares. **Fonte:** Adaptado de Rivaroli (2011).

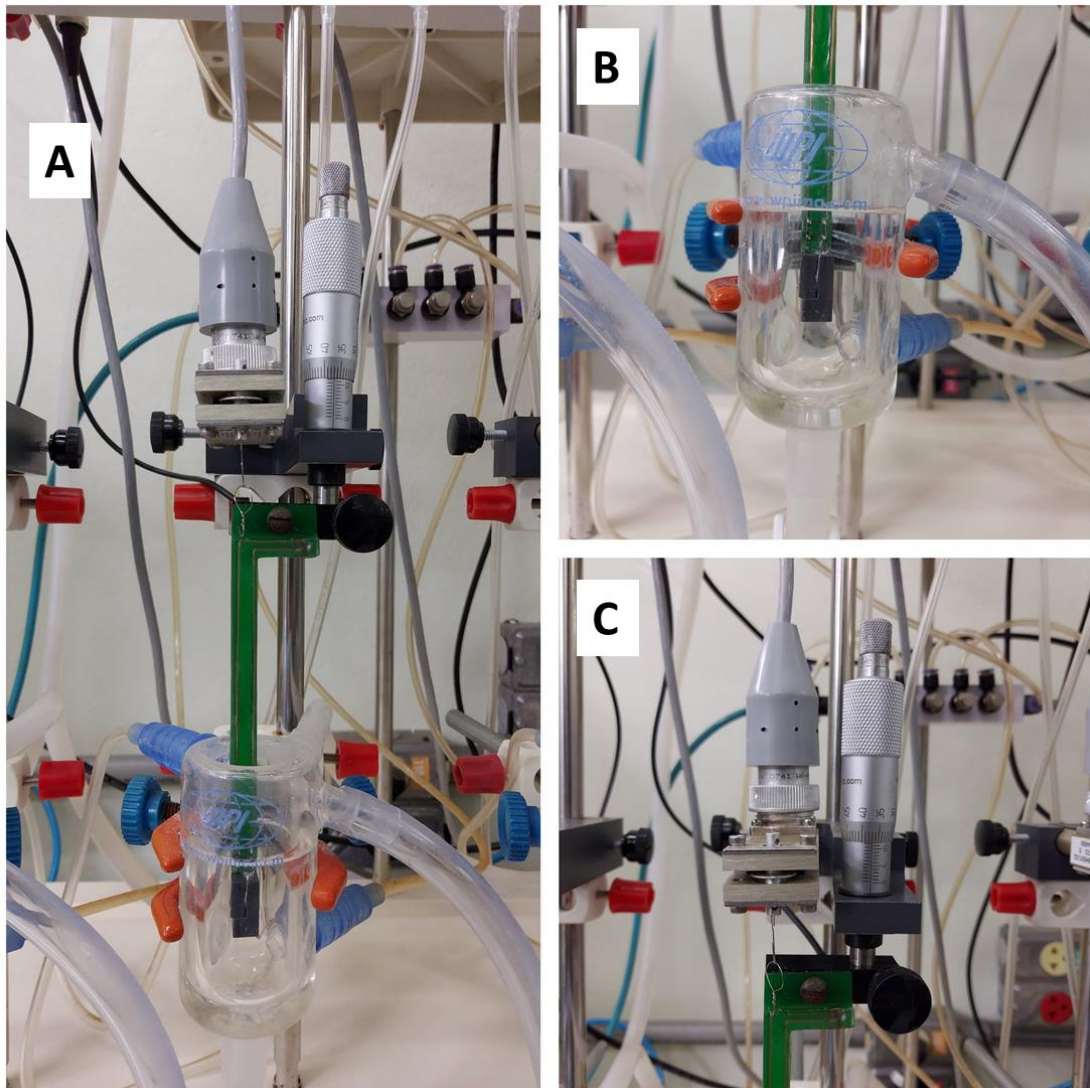
As extremidades das tiras ventriculares foram presas em duas pequenas espirais metálicas e as preparações foram suspensas verticalmente em banhos (Figura 16, B) termostatizados a 25°C (Figura 15, B) contendo a solução fisiológica descrita acima e dotados de borbulhamento constante de mistura carbogênica (Figura 15, A) composta de 2% CO<sub>2</sub> e 98% O<sub>2</sub>. A figura 15 exhibe o conjunto do setup experimental, contendo os principais componentes para realização dos experimentos.

Figura 15 - Setup experimental



Setup experimental. **A)** cilindro de mistura carbogênica composto por 2% de CO<sub>2</sub> e 98% de O<sub>2</sub>. **B)** banho responsável por manter a temperatura estável à 25°C. **C)** estimulador elétrico GRASS S88 Stimulator e sistema de aquisição de dados Biopac MP150. **D)** cubetas de experimentação e transdutores de força isométricas acoplados ao estimulador elétrico. **Fonte:** autor.

**Figura 16 - Setup experimental: cubeta e micro-estirador**



Detalhe do setup experimental. **A)** cubeta e micro-estirador. **B)** cubeta de experimentação. **C)** micro-estirador. **Fonte:** autor.

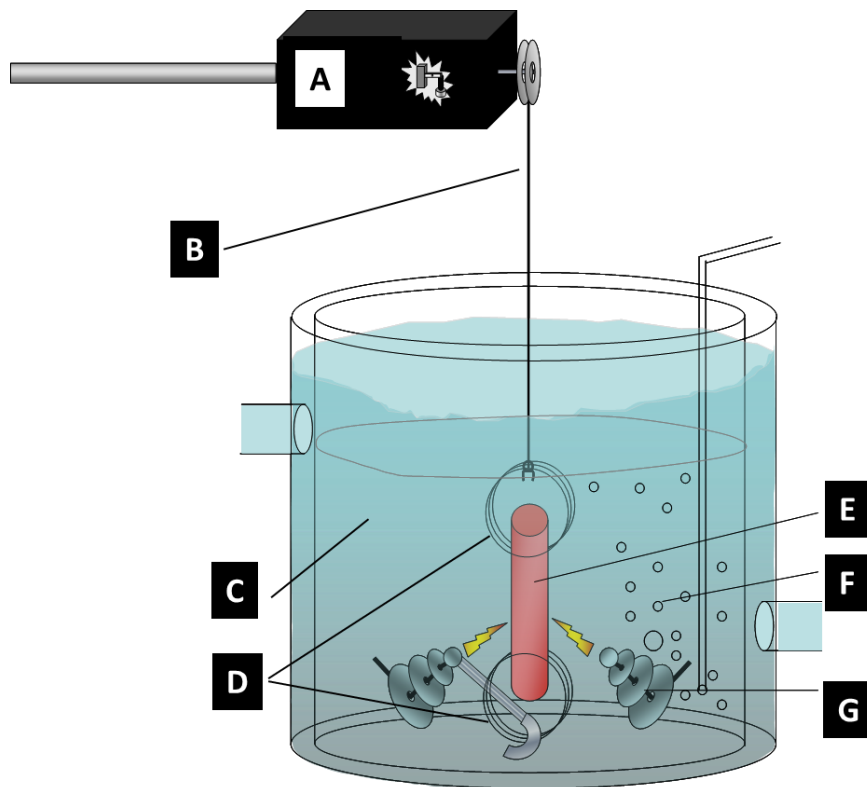
A espiral metálica de uma extremidade da tira foi fixada a um gancho em torno de um par de eletrodos de estimulação (Figura 17, G e Figura 18, E). A outra espiral foi conectada a um transdutor de força isométrica (Figura 17, A e Figura 18, A) (Grass FT.03 Transducer, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) por meio de um fio de aço inoxidável (Figura 17, B e Figura 18, B). Os eletrodos de estimulação foram acoplados a um estimulador (Figura 15, C) (Grass S88 Stimulator, West Warwick, RI, USA), que permitiu a estimulação elétrica das tiras em diferentes taxas gerando pulsos elétricos quadrados de 8 ms com uma tensão 50% acima do limiar de força (~ 80V, 100 mA). Os transdutores de força isométrica foram acoplados ao sistema de aquisição de dados (Figura 15, C) Biopac MP150 (Figura 15, C) (Biopac Systems, Inc.,



USA) com software de aquisição e análise AcqKnowledge (Biopac Systems Inc., USA).

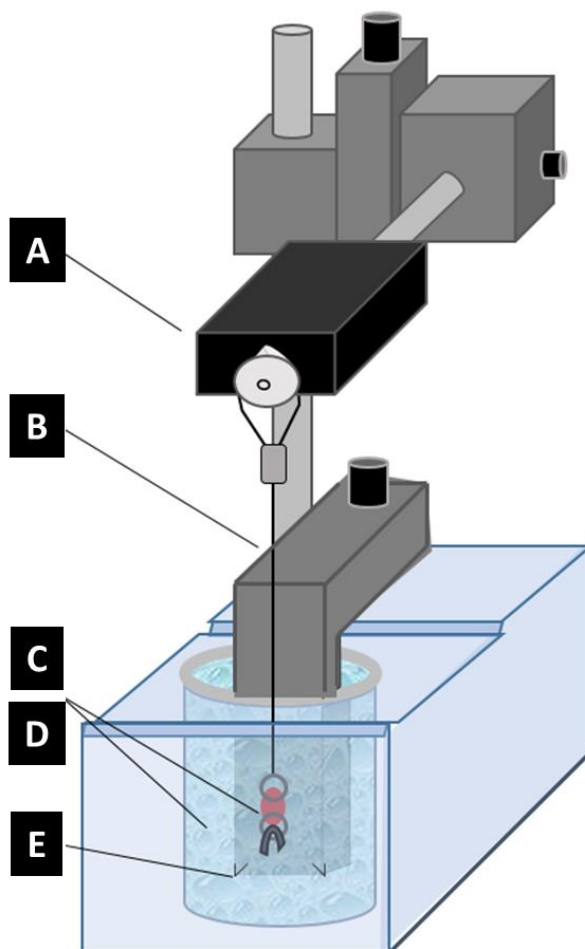
As tiras inicialmente foram estimuladas e estabilizadas a uma frequência constante de 0,2 Hz (12 bpm) antes do início dos protocolos experimentais descritos abaixo. Foram realizados estiramentos das tiras ventriculares utilizando micromanipuladores (Figura 18), aumentando-se a distância entre o transdutor de força isométrica e o gancho de fixação. Esses estiramentos foram realizados para que a relação entre o comprimento da tira ventricular e o pico de tensão pudesse ser obtida de acordo com a lei de Frank-Starling, obtendo dessa forma a força de contração cardíaca máxima de acordo com o grau de estiramento da fibra cardíaca (ALLEN; KENTISH, 1985).

**Figura 17** - Ilustração da cubeta experimental e seus componentes



Detalhe ilustrado do setup experimental (cubeta). **A)** transdutor de força isométrico; **B)** Linha metálica conectada as espirais metálicas; **C)** Solução fisiológica própria para a espécie (descrita na metodologia); **D)** Espirais metálicas de fixação da tira ventricular; **E)** Tira ventricular; **F)** Solução carbogênica de 98% O<sub>2</sub> e 2% CO<sub>2</sub>; **G)** Eletrodos de platina responsáveis pela estimulação elétrica. **Fonte:** Adaptado de Rivaroli (2011).

**Figura 18** - Ilustração do micro-estirador e seus componentes



Detalhe do setup experimental (micro-estirador). **A)** Transdutor de força isométrico; **B)** Linha metálica; **C)** Tira ventricular; **D)** Solução fisiológica própria para a espécie; **E)** Eletrodos de platina responsáveis pela estimulação elétrica. **Fonte:** Adaptado de Rivaroli (2011).

### 3.6 Aplicação dos protocolos experimentais

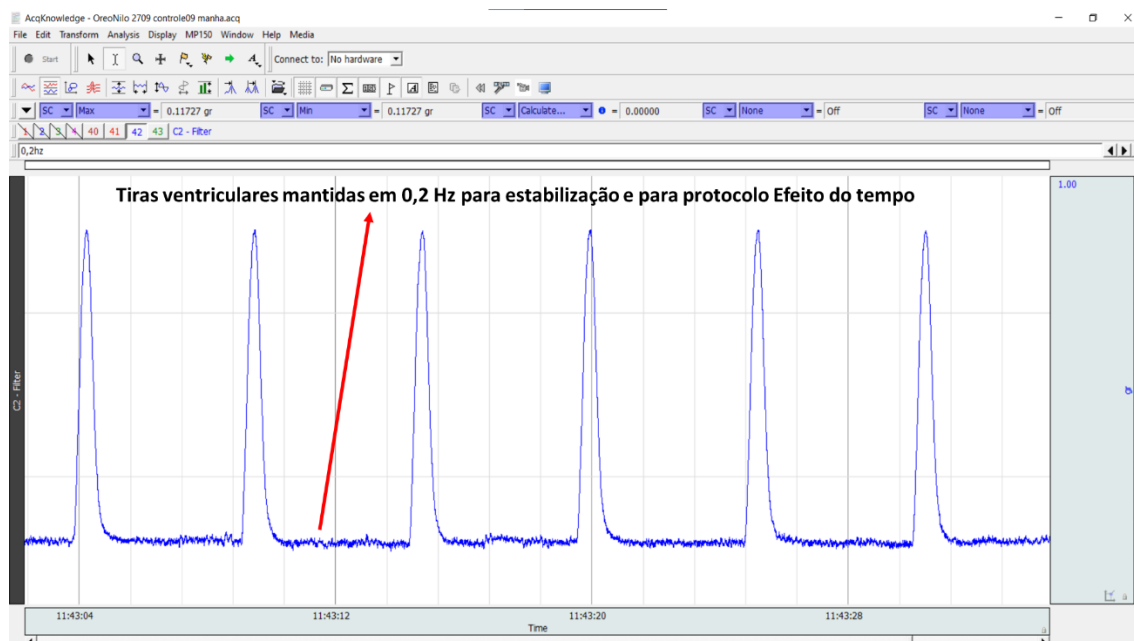
Todos os protocolos experimentais foram aplicados nas preparações de tiras ventriculares dos animais dos grupos controle e expostos a diferentes concentrações de MPAS.

#### 3.6.1 Efeito do tempo

As tiras ventriculares foram mantidas a 0,2 Hz (12 bpm) a 25 °C por um período de 30 minutos, durante o qual as ondas de contração foram registradas ininterruptamente para avaliar a possível ocorrência de uma deterioração da força de contração isométrica ou alterações na dinâmica cardíaca no decorrer do período experimental. Este protocolo permite avaliar o estado contrátil das tiras além de possibilitar correções dos parâmetros obtidos nos demais protocolos experimentais,

em caso de deterioração da força. A figura 19 apresenta uma imagem do software de aquisição AcqKnowledge e a aplicação do protocolo Efeito do tempo.

**Figura 19** - Exemplo de registros do Protocolo Efeito do tempo no software de aquisição de dados AcqKnowledge



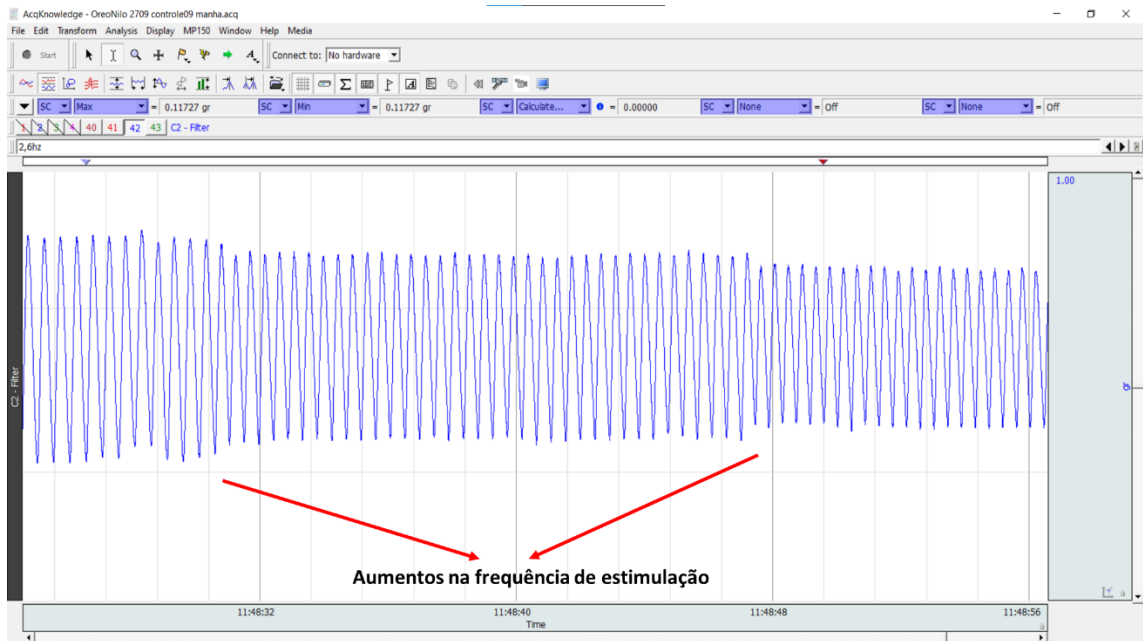
Aplicação do protocolo de Efeito do tempo. Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas pelas tiras ventriculares de tilápia, *O. niloticus*, na frequência de estimulação de 0,2 Hz (12 bpm). As tiras foram mantidas na frequência de 0,2 Hz por 30 minutos. **Fonte:** autor.

### 3.6.2 Efeito de Incrementos Graduais na Frequência de Estimulação Elétrica (relação força-frequência)

Este protocolo foi realizado com o objetivo de determinar a capacidade do miocárdio do animal em manter o acoplamento excitação-contração (E-C) frente a incrementos da frequência de estimulação elétrica, a partir de 0,2 Hz. Foi considerada a frequência máxima de estimulação aquela em que pelo menos 80% das tiras ainda foram capazes de se contrair regularmente. Foi aplicado um fator de correção em porcentagem baseado na deterioração da força de contração durante o protocolo aplicado anteriormente (efeito do tempo). A figura 20 apresenta exemplos de registros do protocolo efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no software de aquisição de dados AcqKnowledge.



**Figura 20** - Exemplo de registros do Protocolo Efeito do Incremento gradual na Frequência de Estimulação Elétrica no software de aquisição de dados AcqKnowledge

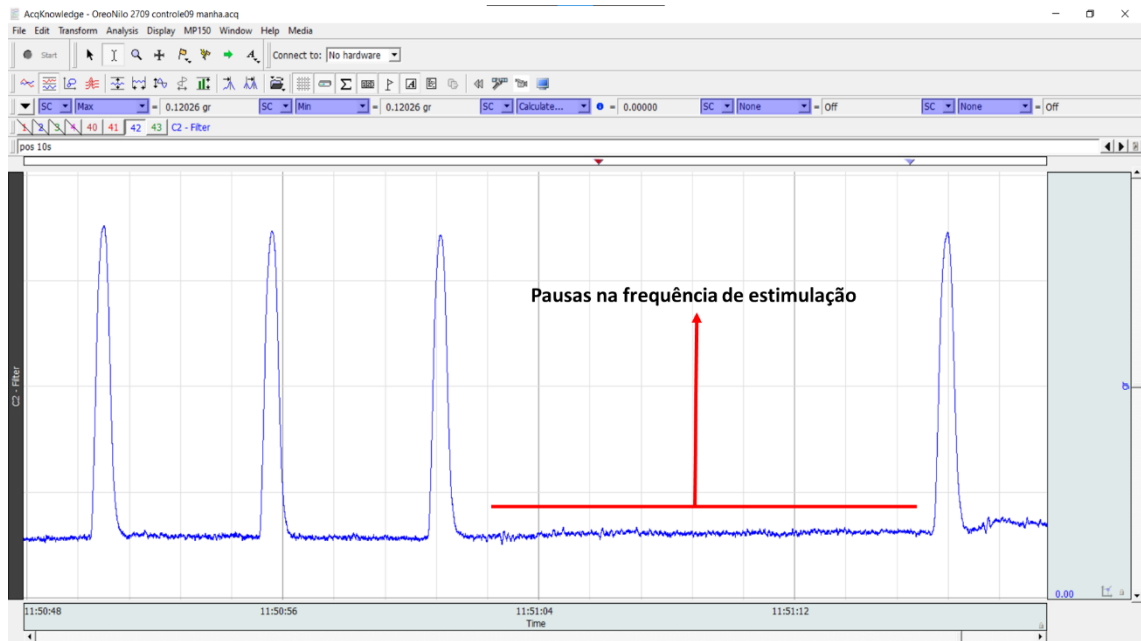


Aplicação do protocolo de força-frequência. Registros típicos de contrações isométricas desenvolvidas pelas tiras ventriculares de tilápia, *O. niloticus*, em diferentes frequências de estimulação. **Fonte:** autor.

### 3.6.3 Pós-Pausa

Após a aplicação do protocolo de força-frequência as tiras voltaram a ser estimuladas a 0,2 Hz, sendo submetidas a pausas na estimulação elétrica de 10, 30, 60 e 300 segundos. A primeira contração após a pausa foi analisada a fim de se avaliar a capacidade de armazenamento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . A figura 21 apresenta exemplos de registros do protocolo de pausas na frequência de estimulação no software de aquisição de dados AcqKnowledge.

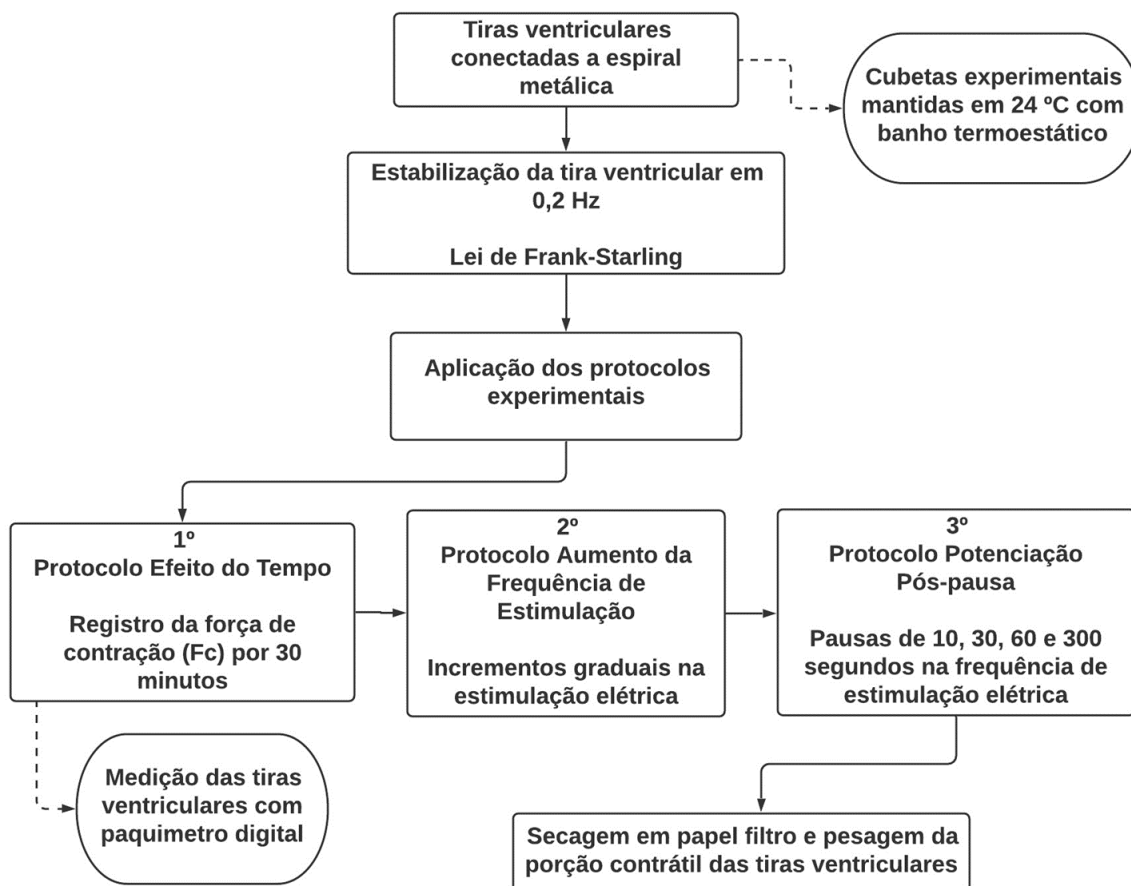
**Figura 21** - Exemplo de registros do Protocolo Potenciação pós-pausa no software de aquisição de dados AcqKnowledge



Aplicação do protocolo de Potenciação pós-pausa. Registros típicos da força de contração isométrica desenvolvida pelas tiras ventriculares de tilápia, *O. niloticus*, após a estabilização a 0,2 Hz e suas respectivas potenciações após pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 segundos. **Fonte:** autor.

A figura 22 sintetiza a aplicação dos protocolos descritos anteriormente, por ordem de aplicação e demais processos envolvidos durante a aplicação dos protocolos.

**Figura 22** - Fluxograma da aplicação dos protocolos experimentais nas tiras ventriculares



Fluxograma das etapas contidas nos experimentos a partir da eutanásia dos animais. Este fluxograma contém desde a fixação das tiras ventriculares nas espirais metálicas até a aplicação dos protocolos experimentais. **Fonte:** elaborado pelo autor.

### 3.7 Forma de apresentação dos dados

Ao término de cada protocolo, as tiras ventriculares foram levemente secas em papel de filtro e o peso úmido foi determinado da porção da tira cujas contrações isométricas haviam sido registradas. A partir da massa e do comprimento da área contrátil calculou-se a área de seção transversal (CSA – “*cross-sectional area*” – mm<sup>2</sup>), assumindo que a densidade do coração seja de 1,06 g.cm<sup>-3</sup> (LAYLAND et al, 1995). Os seguintes parâmetros foram analisados:

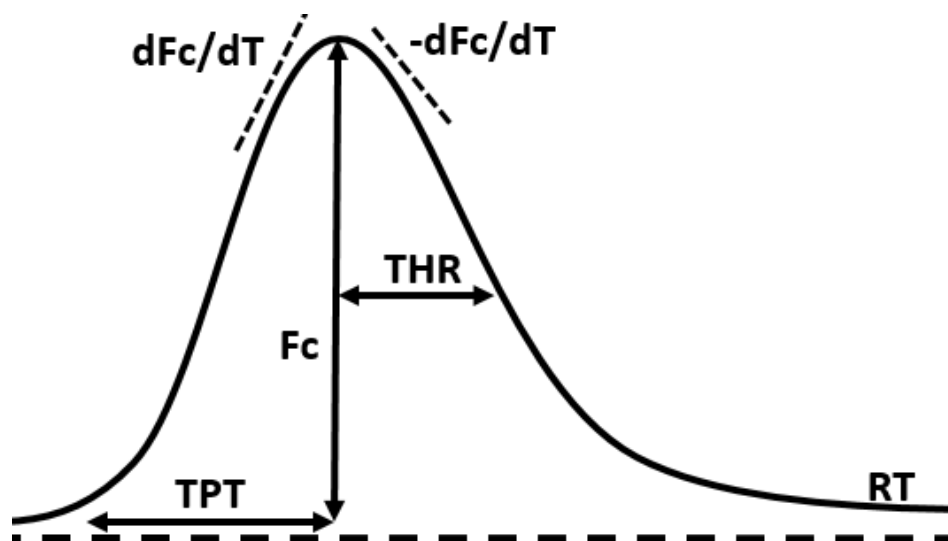
- a) Força de contração (Fc): expressa em mN.mm<sup>-2</sup>. A Fc é a diferença entre os valores do pico de tensão isométrica e da tensão de repouso dividida pelo valor CSA de sua respectiva tira ventricular.

- b) Tempo para o pico de força (TPT – “*time to peak tension*”): representado em valores absolutos expressos em ms. O TPT é o tempo em que cada contração isométrica levou para atingir o pico máximo de tensão.
- c) Tempo para metade do relaxamento (THR – “*time to half relaxation*”): representado em valores absolutos expressos em ms. O THR é o tempo em que cada contração isométrica levou para relaxar 50% a partir do pico máximo de tensão.
- d) Taxa de contração ( $dF_c/dT$  – derivada máxima da contração): representada em valores normalizados expressos em  $mN \cdot mm^{-2} \cdot s^{-1}$ .
- e) Taxa de relaxamento ( $-dF_c/dT$  – derivada máxima do relaxamento): representada em valores normalizados expressos em  $mN \cdot mm^{-2} \cdot s^{-1}$ .
- f) Linha de base ou tensão de repouso (RT – “*resting tension*”): representado representada em valores normalizados expressos em  $mN \cdot mm^{-2}$ .
- g) Capacidade de bombeamento cardíaco (CBC): índice calculado como o produto da  $F_c$  pela frequência de estimulação e expresso em  $mN \cdot mm^{-2} \cdot s^{-1}$

A figura 23 contém uma ilustração com todos os parâmetros supracitados e o que eles representam nos registros de força de contração isométrica adquiridos pelo software de aquisição AcqKnowledge.

Adicionalmente, todas as variáveis testadas foram representadas em porcentagem em relação a frequência de 0,2 Hz para que verificasse seu comportamento ao longo do incremento de estimulação. Nos experimentos onde foi analisada a tensão ( $F_c$ ) pós-repouso, os valores obtidos foram expressos como uma porcentagem em relação à última contração precedente ao repouso.

**Figura 23** - Parâmetros avaliados nos registros de força de contração isométrica das tiras ventriculares



Variáveis medidas nos registros de força de contração isométrica dos diferentes protocolos experimentais. **F<sub>c</sub>**: força de contração isométrica; **TPT**: tempo para o pico máximo de tensão; **THR**: tempo para 50% do relaxamento; **dF<sub>c</sub>/dT**: taxa de contração; **-dF<sub>c</sub>/dT**: taxa de relaxamento; **RT**: linha de base ou tensão de repouso. **Fonte**: elaborado pelo autor.

### 3.8 Análises complementares após a exposição a 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS

Após a obtenção dos resultados advindos dos protocolos de estudo da contratilidade miocárdica *ex vivo* de tilápia, foram selecionados os grupos controle e exposto MPAS 1 (exposto a 1,0 g.L<sup>-1</sup>, grupo de maior concentração de MPAS), por exibirem os resultados mais expressivos entre as concentrações testadas.

Uma nova exposição foi realizada com o grupo MPAS 1 (Ct, n = 15; MPAS 1, n = 15), grupo que apresentou os resultados mais expressivos, para coleta de amostras de sangue e para coleta do coração para a realização de análises de biomarcadores fisiológicos e bioquímicos adicionais.

Os animais foram submetidos às mesmas condições das exposições anteriores, sendo coletados após o período de 96 horas de exposição ao MPAS. Amostras de sangue (0,5 a 1,0 mL) foram coletadas por meio de punção da veia caudal, com seringas heparinizadas. Em seguida, os animais foram imediatamente sacrificados por secção medular. Não foi utilizado qualquer tipo de anestésico para evitar alterações na atividade das enzimas antioxidantes (WDZIECZAK et al., 1982). Uma parte do sangue foi utilizada para a quantificação de hemoglobina e o restante foi centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C para a obtenção do plasma.

Os corações foram lavados em solução salina 0,9% para retirada de impurezas e secos em papel filtro e junto com as amostras de plasma foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer (-80°C).

Durante a coleta os animais foram medidos (peso e comprimento total) e os fígados e ventrículos foram pesados para obtenção da massa úmida.

Com a simples medição desses parâmetros foi possível obter índices, como o hepatossomático (IHS), massa ventricular relativa (MVR) e fator de condição (K). Todos os índices utilizados estão descritos a seguir.

### **3.8.1 Índices Organo-somáticos**

Os Índices organo-somáticos foram obtidos para avaliar o estado de saúde geral dos animais. Os índices estão descritos a seguir.

#### **3.8.1.1 Índice Hepatossomático (IHS)**

O índice hepatossomático (IHS) reflete o estoque de energia no fígado (glicogênio), responsável por ser uma importante fonte de armazenamento da energia consumida pelo animal (CYRINO et al., 2000). O IHS foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$IHS = (F \div P) \times 100$$

Onde:

IHS = índice hepatossomático;

F = peso do fígado (g);

P = peso do animal (g).

#### **3.8.1.2 Massa Ventricular Relativa (MVR)**

A massa ventricular relativa (MVR) foi calculada para verificar a reorganização estrutural do tecido cardíaco como os processos de hipertrofia e/ou hiperplasia dos cardiomiócitos (SUN et al., 2009) que podem influenciar variáveis como o débito cardíaco. Alterações neste parâmetro podem estar correlacionadas com os parâmetros de contratilidade cardíaca avaliados neste presente trabalho. A fórmula utilizada para calcular a MVR está descrita a seguir:

$$MVR = (Vp \div P) \times 100$$

Onde:

MVR = massa ventricular relativa;

Vp = peso do ventrículo (g);

P = peso do animal (g).

### 3.8.1.3 Fator de condição (K)

O fator de condição (K) foi obtido para verificar o estado fisiológico dos animais, partindo do pressuposto que indivíduos com certo peso em dado comprimento estão em condições melhores (LIMA-JUNIOR; GOITEIN, 2006). O fator de condição foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$K = (100 \times P) \div C^3$$

Onde:

K = fator de condição;

P = peso do animal (g);

C = comprimento total do animal (cm).

## 3.8.2 Biomarcadores bioquímicos

### 3.8.2.1 Determinação de hemoglobina total

Para a determinação da hemoglobina total, foi utilizado 10 µl de sangue adicionados a 2 mL de solução Drabkin (0,5 g de KCN, 1,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2,0 g de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] para 1 L de água destilada q.s.p.). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectramax I3 (Molecular Devices, USA) a λ = 540 nm (DRABKIN, 1948) e o cálculo da concentração foi realizado a partir de uma curva-padrão feita com o padrão de hemoglobina Labtest. Os valores foram expressos em grama por decilitro (g/dL).

### **3.8.2.2 Determinação do teor de proteína total**

O teor de proteína total do plasma foi determinado utilizando o método clássico de Bradford com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976), utilizando albumina bovina como padrão. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro Spectramax I3 (Molecular Devices, USA) a  $\lambda = 595$  nm. Os valores de proteína total foram expressos em grama por decilitro (g/dL).

### **3.8.2.3 Determinação da glicose plasmática**

Para a determinação do nível de glicose no plasma foi utilizado o kit Labtest Glicose Liquiform, baseado em um sistema enzimático capaz de determinar a glicose no sangue, líquido e líquidos ascético, pleural e sinovial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG, Brasil, 2011). A análise foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. As amostras com o reativo de uso foram incubadas em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. A leituras do branco, do padrão de glicose e das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Bel (UV-VIS, BEL Engineering, Italy) a  $\lambda = 505$  nm. Os valores foram expressos em miligrama por decilitro (mg/dL).

### **3.8.2.4 Determinação do cortisol plasmático**

A concentração de cortisol no plasma foi determinada pelo método ELISA utilizando-se o kit Enzo Life Sciences (Inc., Farmingdale, NY, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram pipetados 100  $\mu$ L dos padrões de cortisol (156, 313, 625, 1250, 2500 e 5000 pg/ml) e 100  $\mu$ L de amostras de plasma em microplaca com anticorpo específico para o cortisol aderido. Após a incubação por 2 horas em *shaker* a 500 rpm em temperatura ambiente, foram pipetados 50  $\mu$ L do tampão de ensaio, 50  $\mu$ L de conjugado azul e 50  $\mu$ L de anticorpo amarelo, sucessivamente. Após estes procedimentos, a placa foi incubada em repouso por 1 hora e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectramax I3 (Molecular Devices, USA) a  $\lambda = 405$  nm. Os valores foram expressos em micrograma por mililitro ( $\mu$ g/mL).



### 3.8.2.5 Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH)

Para a determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no sangue total e no tecido cardíaco foi utilizada a metodologia de Beutler et al (1963), usando o reativo de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico – DTNB) adaptada por Wilhelm-Filho (1996) e Wilhelm-Filho et al (2005).

Logo após a coleta de sangue as amostras (100 µL) foram tratadas com TCA (300 µl) 30% na proporção 1:3. Após o tratamento com TCA, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram utilizados para análise do conteúdo de GSH. Foram adicionados 0,25 mM de DTNB em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 na proporção 1:4 aos sobrenadantes dos extratos ácidos. A reação da GSH com o reativo de Elmann resulta na formação do ânion tiolato, que foi determinado em espectrofotômetro Bel (UV-VIS, BEL Engineering, Italy) a  $\lambda = 412$  nm. O coeficiente de extinção molar de 14,1 mM.cm<sup>-1</sup> da GSH nessas condições foi utilizado verificar a concentração da GSH no plasma (mM). Os valores foram expressos em mM.

Para o tecido cardíaco, os ventrículos dos grupos Ct e MPAS 1 foram homogeneizados em 500 µL de tampão hiperosmótico (Sacarose 250 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). O homogeneizado foi obtido com o auxílio de um homogeneizador IKA T10 basic ULTRA-TURRAX R), que provoca a ruptura de tecidos por corte com lâminas e cavitação e, posteriormente foram centrifugados a 10000 G por um período de 40 minutos a uma temperatura de 4° C. A determinação de GSH em amostras de coração foram preparadas de acordo com o descrito acima, no entanto, foram utilizados 300 µL do sobrenadante de homogeneizados de corações do grupo exposto e controle. Os valores foram expressos em nmol.mg proteína<sup>-1</sup>.

### 3.8.2.6 Determinação dos níveis lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação lipídica foi quantificada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation-Xylenol Orange*) conforme descrito por Jiang et al (1992). Este método consiste na oxidação do Fe<sup>2+</sup> (sulfato ferroso amoniacal) a Fe<sup>3+</sup> pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado de xilenol. Cerca de 80 µL de amostras de plasma, tratada com TCA 12% (1:1), foram incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente, com 900 µl de mistura reativa contendo 100 µM de alaranjado de xilenol, 250 µM de FeSO<sub>4</sub> (sulfato ferroso amoniacal), 25

mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 4 mM de butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol 90% (v/v). O Fe<sup>3+</sup> formado na presença de hidroperóxidos reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido com um pico de absorção a  $\lambda = 560$  nm, comprimento de onda em que as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Bel (UV-VIS, BEL Engineering, Italy). Para a análise no tecido cardíaco, os ventrículos foram homogeneizados de acordo com os procedimentos descritos acima (ver item 3.8.2.5).

Para a quantificação dos níveis de LPO foi utilizado o coeficiente de extinção molar de  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  do complexo Fe<sup>3+</sup> alaranjado de xilenol para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxido linoleico ou butil hidroperóxido (JIANG et al., 1991). Os valores foram expressos em micromolar ( $\mu\text{M}$ ) para o plasma e em nmol.mg proteína<sup>-1</sup> para o tecido cardíaco.

### **3.8.2.7 Determinação do conteúdo de proteína carbonilada (PC)**

A determinação do conteúdo de proteína carbonilada foi utilizada para verificação do nível de dano oxidativo nas proteínas. As amostras de plasma foram incubadas em 10 mM DNPH (dinitrofenilhidrazina) preparada em HCl 2,5M, no escuro e sob agitação a cada 10 minutos (REZNICK; PACKER, 1994). As amostras foram tratadas com TCA 50% e colocadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 8000g por 10 minutos. O pellet foi lavado 3 vezes com solução etanol:acetato de etila na razão 1:1 (v/v). Ao término da última lavagem foi adicionado 1 mL de guanidina 6M em cada amostra, sendo agitadas e colocadas em banho-maria (37 °C) por 30 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas novamente a 8000g por 10 minutos para a retirada de partículas insolúveis e, posteriormente, os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro Bel (UV-VIS, BEL Engineering, Italy) a  $\lambda = 370$  nm. Para a análise no tecido cardíaco, os ventrículos foram homogeneizados de acordo com os procedimentos descritos acima (ver item 3.8.2.5).

O conteúdo de grupamentos carbonil foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar da DNPH  $\epsilon_{370\text{nm}} = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Os valores de proteína carbonilada foram expressos em nmol.mg de proteína<sup>-1</sup>.

### 3.8.3 Procedimentos experimentais para análise de Western Blotting

A técnica de Western Blotting é utilizada para separar e identificar proteínas, mesmo em baixas concentrações, além de permitir a investigação da abundância proteica, atividade de quinase, localização celular, interação proteína-proteína, ou monitoramento de modificações pós-traducionais, ubiquitinação, glicosilação, metilação etc. (BASS et al., 2017). Este procedimento consiste em 3 etapas principais, sendo elas: 1) separação das proteínas contidas nas amostras de acordo com o tamanho pela técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE; 2) transferência da proteína para uma membrana, denominada “membrana de transferência”; 3) imersão da membrana de transferência em solução contendo anticorpos primários específicos e, posteriormente, em anticorpos secundários (específicos para os anticorpos primários) para marcação da proteína.

Para a extração das proteínas, os ventrículos foram homogeneizados conforme descrito no item 3.8.2.5, utilizando tampão hiperosmótico (sacarose 250 mM; Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4) e centrifugando a 12000 rpm por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante passou pelo processo de ultra-centrifugação a 100000 g a 4 °C por 60 minutos gerando “pellets”. Os “pellets” foram ressuspensos em cerca de 100 a 150 µL de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4). A quantificação de proteínas nessas amostras foi realizada de acordo com o método de Bradford, com leituras a  $\lambda = 595$  nm em espectrofotômetro (KRUGER, 1994).

Posteriormente, cerca de 100 µg de proteína das amostras foram adicionadas ao tampão de carregamento (Laemmli: uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 µM; Tris-HCl 0,01 M; pH 8,0) e aquecidas a 95 °C durante 5 minutos. Em seguida as amostras foram aplicadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para obter a identificação da proteína NCX. Os géis foram imersos em tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%) e submetidos a uma tensão de 100V por 2 horas em temperatura ambiente.

Ao final do processo de eletroforese, foi realizada a transferência das proteínas dos géis para a membrana de fluoreto de polividileno (PVDF) em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20%; SDS 0,1%) a 4 °C, em um Mini TransBlot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) com corrente constante de 230 mA durante 10 horas. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução com leite desnatado a 5% (Molico, Nestle) em tampão TBS-T (TrisHCl 10 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0,1%; pH 7,5).

As membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos policlonal de coelho anti-NCX1 (A7419, ABclonal, 1:1000) diluído em um tampão TBS-T. Logo após a incubação com o anticorpo primário, foi utilizado o tampão de lavagem TBS-T para que o excesso fosse removido. Em sequência, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário de anti-coelho IgG (0,5 µg/ml, sc-2034, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) conjugados à fosfatase alcalina em temperatura ambiente. Amostras de ventrículos de ratos foram utilizadas para controle da efetividade dos anticorpos.

As bandas foram detectadas utilizando o sistema revelador Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, Laboratories, USA). As membranas foram digitalizadas e as bandas analisadas por densitometria no software *ImageJ*. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.) de densidade óptica normalizadas pela quantidade de actina-I (Santa Cruz Biotechnology, USA) detectada nas amostras.

#### **3.8.4 Análise Multielementar de metais no MPAS e na Água**

A análise multielementar de metais foi realizada em amostras de água e de MPAS. A dosagem de metais na água foi realizada apenas para os grupos controle e MPAS 1. As amostras de água (5 mL) foram acidificadas com ácido nítrico sub-boiling na razão de 2% do volume total de cada amostra. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros de nitrocelulose (0,45 µm) e transferidas para criotubos. Todas as amostras foram mantidas em 4 °C até a análise.

As amostras de MPAS (0,1 g de massa seca) foram digeridas de acordo com Chappaz et al (2012), com 3 mL de ácido nítrico sub-boiling, 500 µL de ácido clorídrico sub-boiling e 500 µL hidroperóxido Suprapur (graduação analítica de 30%), posteriormente foram filtradas em filtros de nitrocelulose 0,45 µm de acordo com EPA et al (1994). Todas as amostras foram transferidas para criotubos e armazenadas a 4 °C (SOUZA et al., 2021).

Para determinar as concentrações de metais foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Q-ICPMS, Tecnologia Agilent 7500 Series CX), equipado com um ASX-100 autosampler (CETAC Technologies, Omaha, NE, EUA). Esta análise foi realizada em parceria com o Instituto de Ciências e

Tecnologia em Alimentos de Córdoba (YCITAC – Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### 3.9 Tratamento estatístico dos dados

Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) de significância foram consideradas.

- Teste t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney para verificar possíveis diferenças significativas entre os grupos expostos (MPAS 001 vs MPAS 01; MPAS 001 vs MPAS 1; MPAS 01 vs MPAS 1) nas variáveis de contratilidade cardíaca e para comparação entre o grupo MPAS 1 e controle nas variáveis bioquímicas. Os dados do protocolo de potenciação pós-pausa foram analisados com o teste de Mann-Whitney (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
- Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas (One-way ANOVA repeated measures), seguida pelo teste de Dunnet de comparações múltiplas para verificar a existência de possíveis diferenças significativas entre os valores de um mesmo grupo experimental, partindo como referência os valores iniciais de cada protocolo (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). ANOVA simples seguida pelo teste de Dunnet para verificar a existência de possíveis diferenças significativas entre os valores dos grupos expostos comparados ao controle em um mesmo protocolo experimental (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Determinação das características físico-químicas da água

Os parâmetros físico-químicos da água, descritos na Tabela 1, foram monitorados em todos os grupos experimentais. A temperatura manteve-se constante ( $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) nos aquários experimentais. Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos para as variáveis pH, oxigênio dissolvido e alcalinidade. Em relação à condutividade, o grupo MPAS 001 apresentou uma redução significativa de 19% neste parâmetro, enquanto o grupo MPAS 1 apresentou aumento significativo de 28% quando comparados ao controle. Em relação a amônia, apenas o grupo MPAS 1 apresentou diferença em relação ao grupo controle, exibindo um aumento significativo de 78% nos valores dessa variável.

**Tabela 1** - Características físico-químicas da água dos grupos controle e dos grupos expostos MPAS 001 ( $0,01\text{ g.L}^{-1}$ ), MPAS 01 ( $0,1\text{ g.L}^{-1}$ ) e MPAS 1 ( $1,0\text{ g.L}^{-1}$ ) ao MPAS.

|   | Controle         | MPAS 001           | MPAS 01          | MPAS 1             |
|---|------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| <b>pH</b>   | $7,36 \pm 0,38$  | $7,78 \pm 0,27$    | $7,29 \pm 0,48$  | $7,32 \pm 0,47$    |
| <b>Oxigênio (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>     | $8,64 \pm 0,06$  | $8,56 \pm 0,07$    | $8,71 \pm 0,07$  | $8,61 \pm 0,09$    |
| <b>Condutividade (<math>\mu\text{S/cm}</math>)</b>  | $52,84 \pm 1,24$ | $44,11 \pm 3,34^*$ | $51,40 \pm 1,12$ | $73,48 \pm 12,9^*$ |
| <b>Amônia (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>       | $0,80 \pm 0,15$  | $1,22 \pm 0,38$    | $0,78 \pm 0,42$  | $3,72 \pm 0,46^*$  |
| <b>Alcalinidade (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b> | $22,00 \pm 2,51$ | $19,83 \pm 1,03$   | $22,92 \pm 2,48$ | $21,17 \pm 2,54$   |

As variáveis foram medidas diariamente durante os dois primeiros conjuntos de experimentos de cada grupo experimental. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Os valores são médias  $\pm$  E.P.M. **Fonte:** elaborado pelo autor.

## 4.2 Observação comportamental dos animais e do MPAS

Os peixes do grupo controle não apresentaram comportamento atípico durante as exposições, com exceção de um peixe de um aquário experimental, onde a disputa por território acometeu na morte de um indivíduo.

Os peixes do grupo MPAS 001 (0,01 g.L<sup>-1</sup>, baixa concentração testada) apresentaram comportamento semelhante aos do grupo controle, apenas um indivíduo morreu durante a exposição, provavelmente relacionado as disputas por território. O pó preto era facilmente observado no fundo do aquário, mesmo nessa baixa concentração.

No grupo MPAS 01 (0,1 g.L<sup>-1</sup>, média concentração testada), os animais apresentaram baixa atividade natatória comparados ao controle. Neste cenário ocorreu a morte de um indivíduo, provavelmente pela disputa por território, assim como nos outros grupos experimentais. A turbidez da água passou a se destacar nessa concentração, apresentando tons marrons.

No grupo MPAS 1 (1,0 g.L<sup>-1</sup>, maior concentração testada), os animais se mantiveram estáveis na coluna de água, com baixa atividade natatória. Os peixes quase sempre buscavam se manter próximos às paredes dos aquários. A visibilidade era quase nula, visto que a água permanecia completamente escura durante as 96 horas de exposição. O pó preto preenchia completamente o fundo do aquário, além de permanecer na coluna de água. Durante a exposição nessa concentração não ocorreu a mortalidade de nenhum animal.

Nas exposições realizadas para as análises adicionais do grupo MPAS 1 (ver item 3.8 dos materiais e métodos), na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup>, os animais apresentaram o mesmo comportamento de se manterem estáveis na coluna de água, com baixa atividade natatória. O comportamento do pó preto (MPAS) também foi igual ao da exposição anterior na mesma concentração. Não ocorreu a mortalidade de nenhum animal.

### 4.3 Experimentos *ex vivo*

#### 4.3.1 Protocolo Efeito do tempo

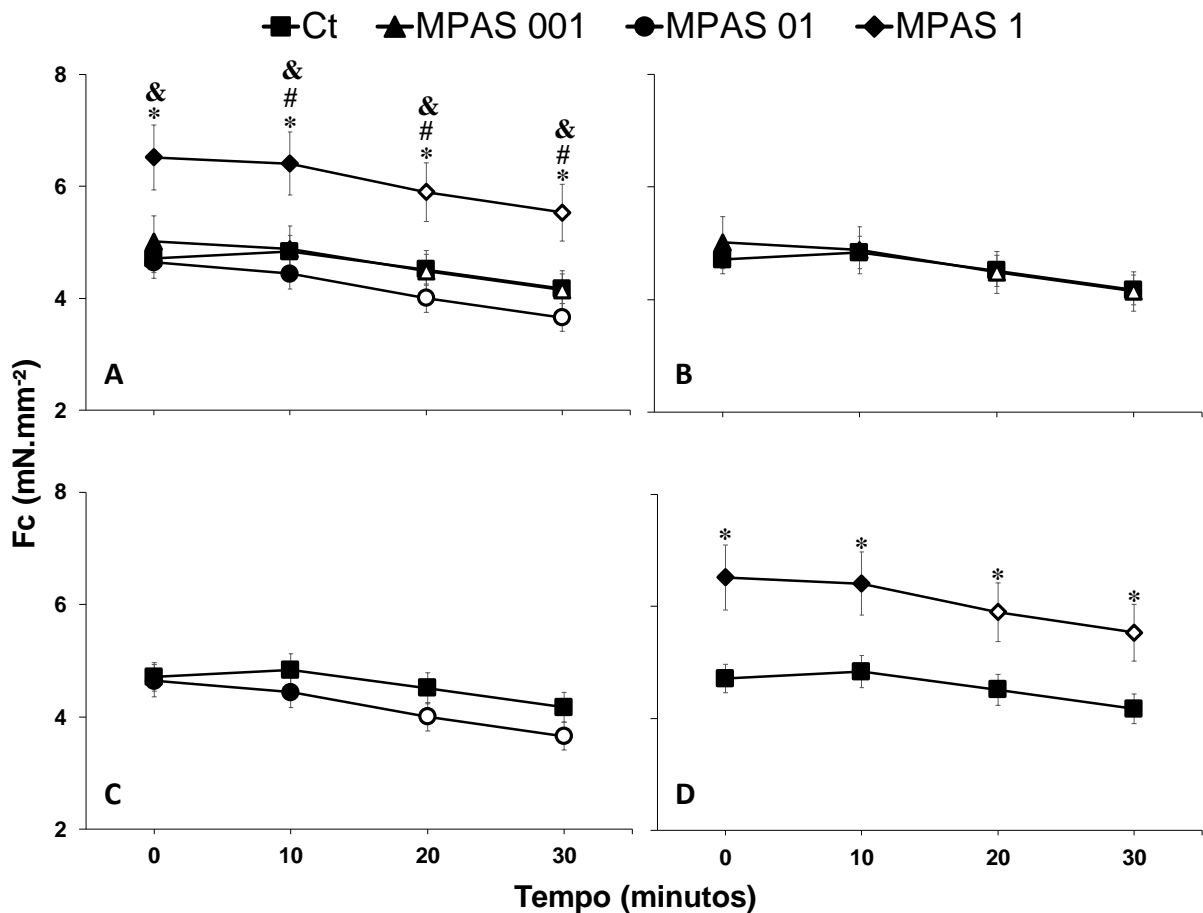
Os valores médios na força de contração ( $F_c$ ) das tiras ventriculares de *O. niloticus* ao longo de 30 minutos estão representados graficamente na figura 24.

Os valores do efeito do tempo na  $F_c$  indicam que o grupo controle foi o único a não perder  $F_c$  significativamente ao longo dos 30 minutos ( $4,55 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2} \pm 0,27$ ). No entanto, o grupo MPAS 001 exibiu redução significativa a partir de 20 minutos, atingindo um valor mínimo de  $4,14 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  aos 30 minutos. O grupo MPAS 01 obteve redução significativa da  $F_c$  a partir de 20 minutos, atingindo o valor mínimo de  $3,65 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  aos 30 minutos. O grupo MPAS 1 obteve redução significativa da  $F_c$  a partir de 20 minutos, atingindo o valor mínimo de  $5,53 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  aos 30 minutos.

Esses valores indicam que o grupo MPAS 1 obteve uma  $F_c$  superior em relação aos demais grupos em todos os intervalos de tempo, com exceção do tempo 0 do grupo MPAS 001. Comparando os valores de  $F_c$  do grupo MPAS 1 com o controle, observa-se um aumento de 25% do grupo exposto. Ao se comparar com o grupo MPAS 001, os valores de  $F_c$  do grupo MPAS 1 foram superiores a partir do tempo 10, sendo 24% superiores. Quando comparado com o grupo MPAS 01, os valores de  $F_c$  do grupo MPAS 1 foram 31% superiores em todos os intervalos de tempo.



**Figura 24 - Efeito do tempo na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos**



Efeito do tempo no parâmetro força de contração das tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao tempo 0. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

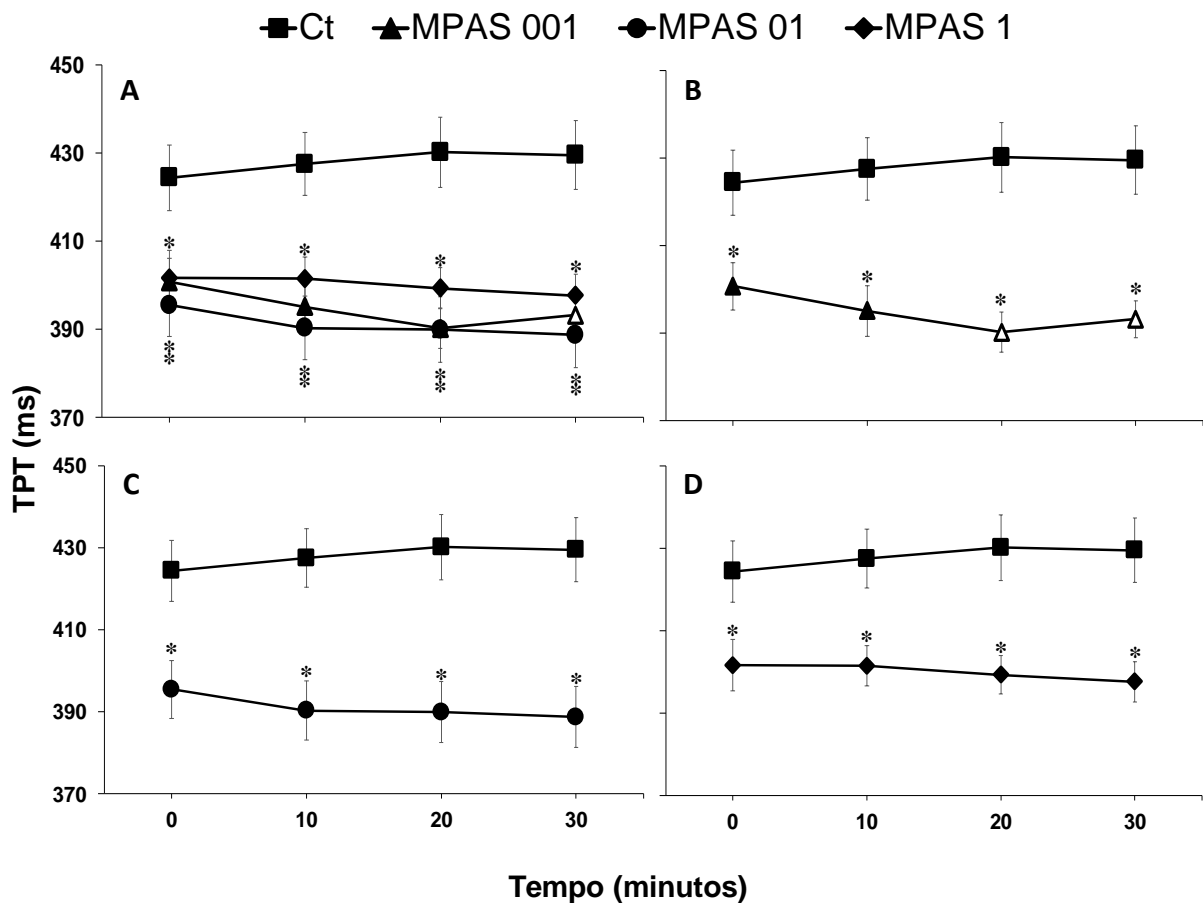
Os valores médios do efeito do tempo no tempo para o pico de tensão (TPT – “*time to peak tension*”) das tiras ventriculares de *O. niloticus* representados graficamente na figura 25.

O efeito do tempo no TPT (ms) indica que o grupo controle não sofreu alterações significativas ao longo dos intervalos de tempo avaliados. O valor de TPT para o grupo controle em 30 minutos foi de 429 ms. O grupo MPAS 001 exibiu uma redução significativa dos valores de TPT a partir de 20 minutos, sendo que o valor mínimo observado foi de 393 ms aos 30 minutos. Para o grupo MPAS 01, não houve alterações significativas ao longo do tempo, atingindo o valor mínimo de 388 ms aos

30 minutos. Por fim, o grupo MPAS 1 não apresentou alterações significativas ao longo do tempo, exibindo um valor mínimo de 397 ms aos 30 minutos.

Todos os grupos expostos mostraram reduções significativas no TPT em relação ao grupo controle.

**Figura 25** - Efeito do tempo no tempo para pico de tensão das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do tempo no parâmetro tempo para o pico de tensão - TPT (ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações (n = 10 para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao tempo 0. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

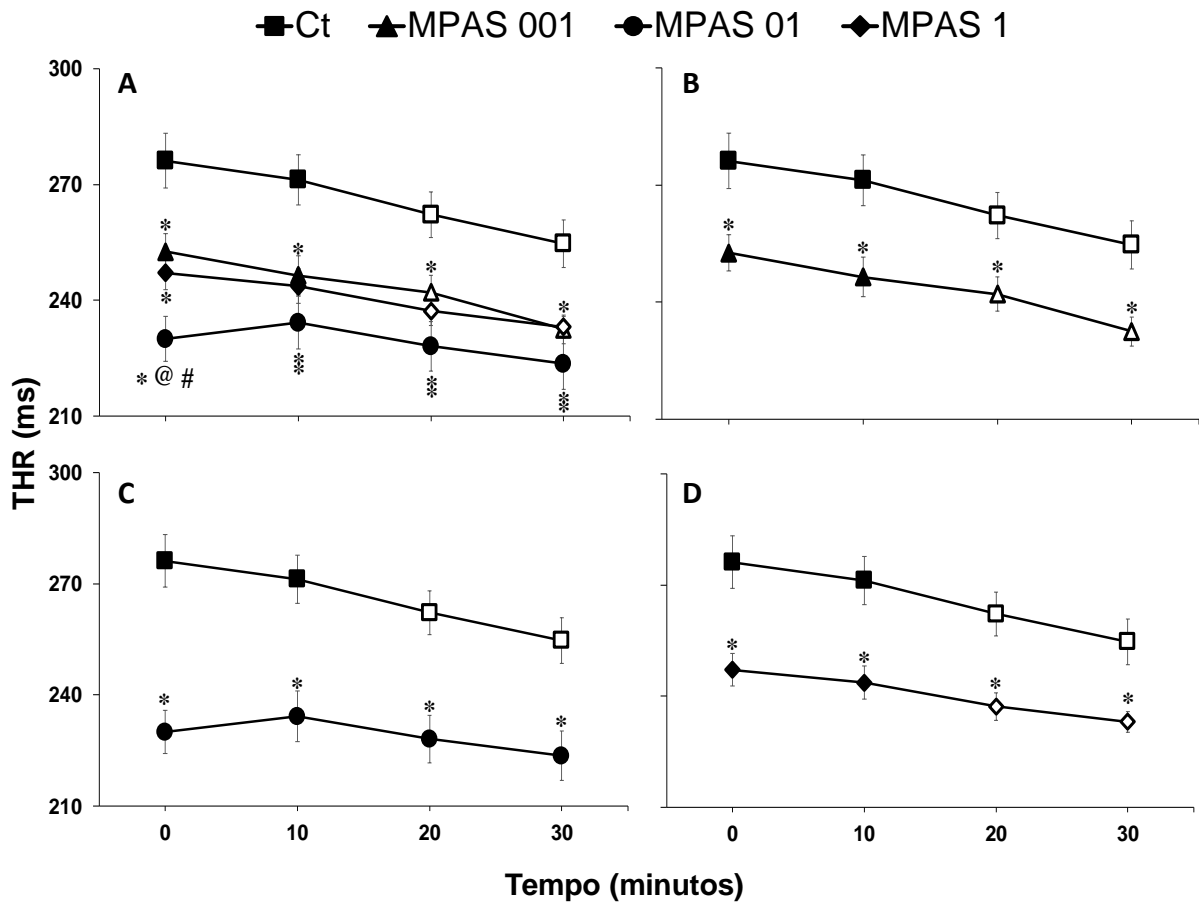
Os valores médios do efeito do tempo no tempo para 50% do relaxamento (THR – “time to half relaxation”) das tiras ventriculares de *O. niloticus* e representados graficamente na figura 26.

O grupo controle sofreu redução significativa do THR a partir de 20 minutos, atingindo o valor de 254 ms aos 30 minutos. O grupo MPAS 001 mostrou uma redução

significativa dos valores de THR a partir de 20 minutos, sendo que o valor mínimo observado foi de 232 ms aos 30 minutos. Para o grupo MPAS 01, não ocorreram alterações significativas ao longo do tempo, atingindo o valor mínimo de 223 ms aos 30 minutos. Por fim, o grupo MPAS 1 apresentou redução significativa do THR a partir de 20 minutos, com um valor mínimo de 233 ms aos 30 minutos.

Todos os grupos expostos exibiram reduções significativas nos valores de THR em relação ao grupo controle, na ordem de 9%, 16% e 11%, para os grupos MPAS 001, MPAS 01 e MPAS 1, respectivamente. O grupo MPAS 01 obteve, ainda, redução significativa no tempo 0 ao ser comparado com os demais grupos expostos, MPAS 001 e MPAS 1. A redução do valor de THR do grupo MPAS 01 comparado ao grupo MPAS 001 foi de 10% e comparado ao grupo MPAS 1 foi de 7%.

**Figura 26** - Efeito do tempo no tempo para metade do relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do tempo no parâmetro tempo para metade do relaxamento – THR (ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao tempo 0. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. @ indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 1. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

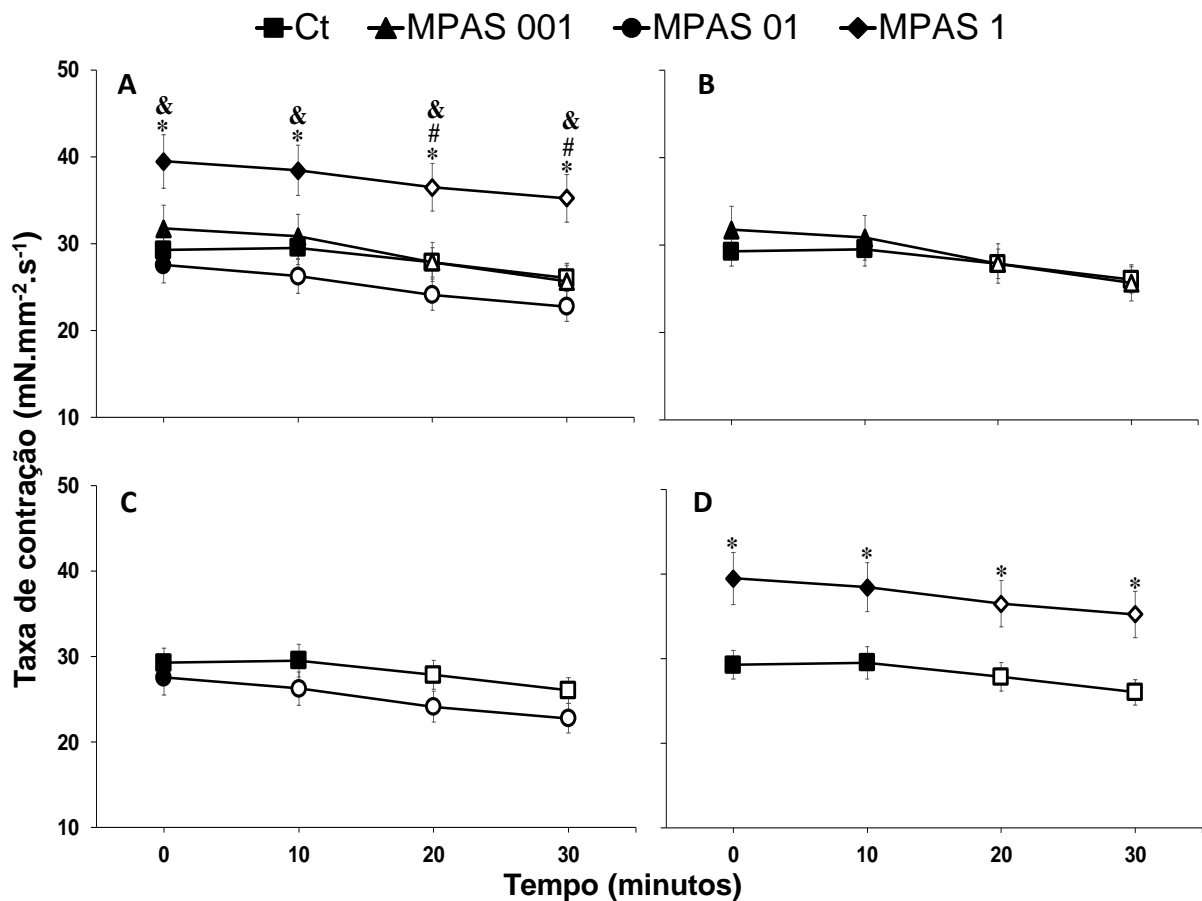
Os valores médios do efeito do tempo na taxa de contração ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 27.

O grupo controle sofreu redução significativa na taxa de contração a partir de 20 minutos. O valor da taxa de contração para o grupo controle em 30 minutos foi de  $26 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . O grupo MPAS 001 exibiu uma redução significativa dos valores da taxa de contração a partir de 20 minutos, sendo que o valor mínimo observado foi de  $25 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aos 30 minutos. Para o grupo MPAS 01, ocorreu diminuição significativa da taxa de contração a partir de 10 minutos, atingindo o valor mínimo de  $22 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aos 30 minutos. Por fim, o grupo MPAS 1 apresentou redução

significativa a partir de 20 minutos, com um valor mínimo de  $35 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aos 30 minutos.

O grupo MPAS 1 apresentou um aumento significativo de 25% na taxa de contração em relação ao controle em todos os intervalos de tempo. No grupo MPAS 1, os valores das taxas de contração foram ainda 33% superiores em relação ao grupo MPAS 01 em todos os intervalos de tempo. Em relação ao grupo MPAS 001, as taxas de contração exibidas pelo grupo MPAS 1 foram 25% superiores nos intervalos de 20 e 30 minutos.

**Figura 27** - Efeito do tempo no tempo na taxa de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



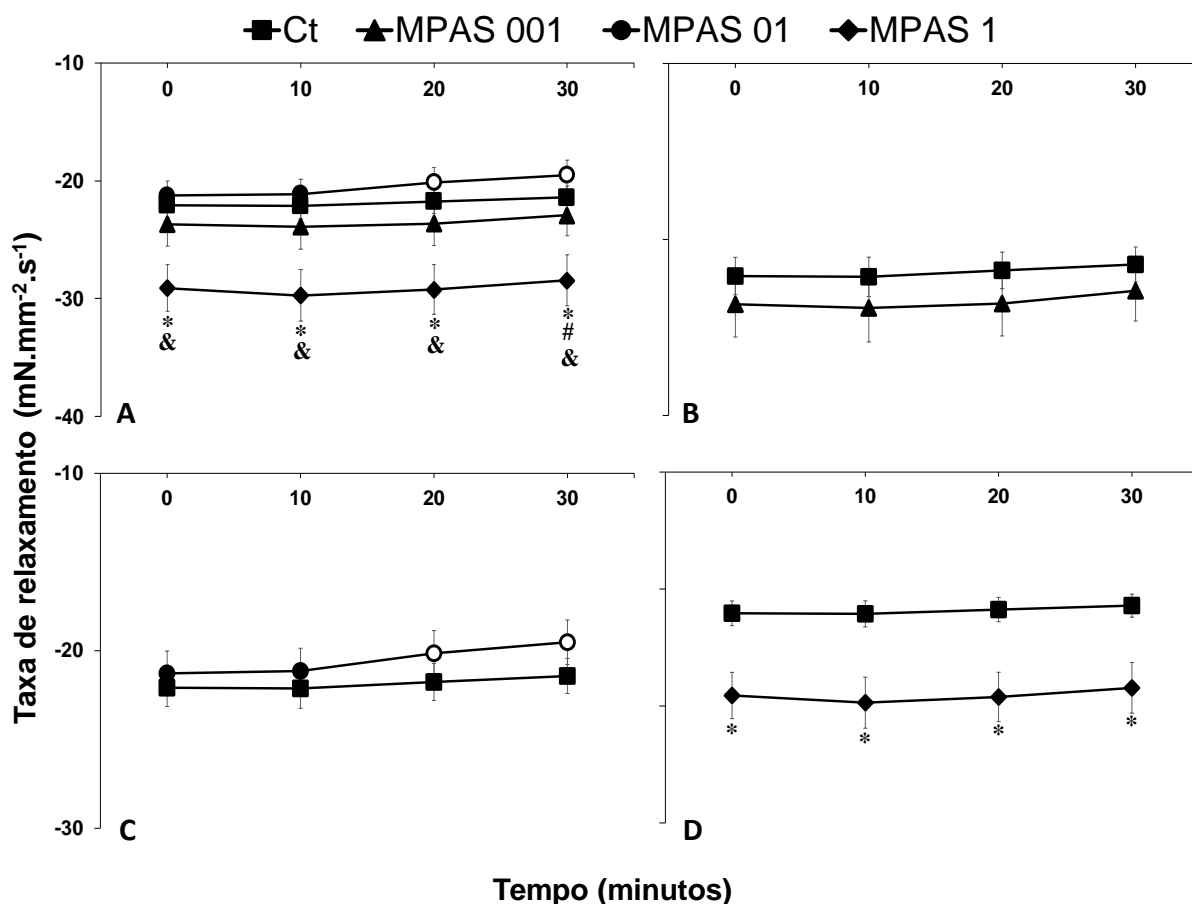
Efeito do tempo no parâmetro taxa de contração de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao tempo 0 ( $P < 0,05$ ). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle. # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Os valores médios do efeito do tempo na taxa de relaxamento ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 28.

O grupo controle não exibiu alterações da taxa de relaxamento ao longo do tempo ( $-21,84 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} \pm 01,05$ ). O grupo MPAS 001 também não exibiu alterações significativas dos valores da taxa de relaxamento ao longo do tempo, sendo que o valor mínimo observado foi de  $22 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aos 30 minutos. Para o grupo MPAS 01, houve redução significativa da taxa de relaxamento a partir de 20 minutos, atingindo o valor mínimo de  $19 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aos 30 minutos. Por fim, o grupo MPAS 1 não apresentou alterações significativas na taxa de relaxamento ao longo do tempo, apresentando um valor mínimo de  $28 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  aos 30 minutos.

O grupo MPAS 1 apresentou um aumento significativo de 25% na taxa de relaxamento em relação ao controle em todos os intervalos de tempo. No grupo MPAS 1, os valores das taxas de relaxamento foram ainda 30% superiores em relação ao grupo MPAS 01 em todos os intervalos de tempo. Em relação ao grupo MPAS 001, as taxas de contração exibidas pelo grupo MPAS 1 foram 19% superiores no tempo de 30 minutos.

**Figura 28** - Efeito do tempo no tempo na taxa de relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do tempo no parâmetro taxa de relaxamento de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações (n = 10 para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação ao tempo 0 (P < 0,05). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle. # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.3.2 Efeito dos incrementos graduais na frequência de estimulação elétrica (relação força-frequência)

Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação no desenvolvimento da força de contração ( $F_c$  – mN.mm<sup>-2</sup>) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 29.

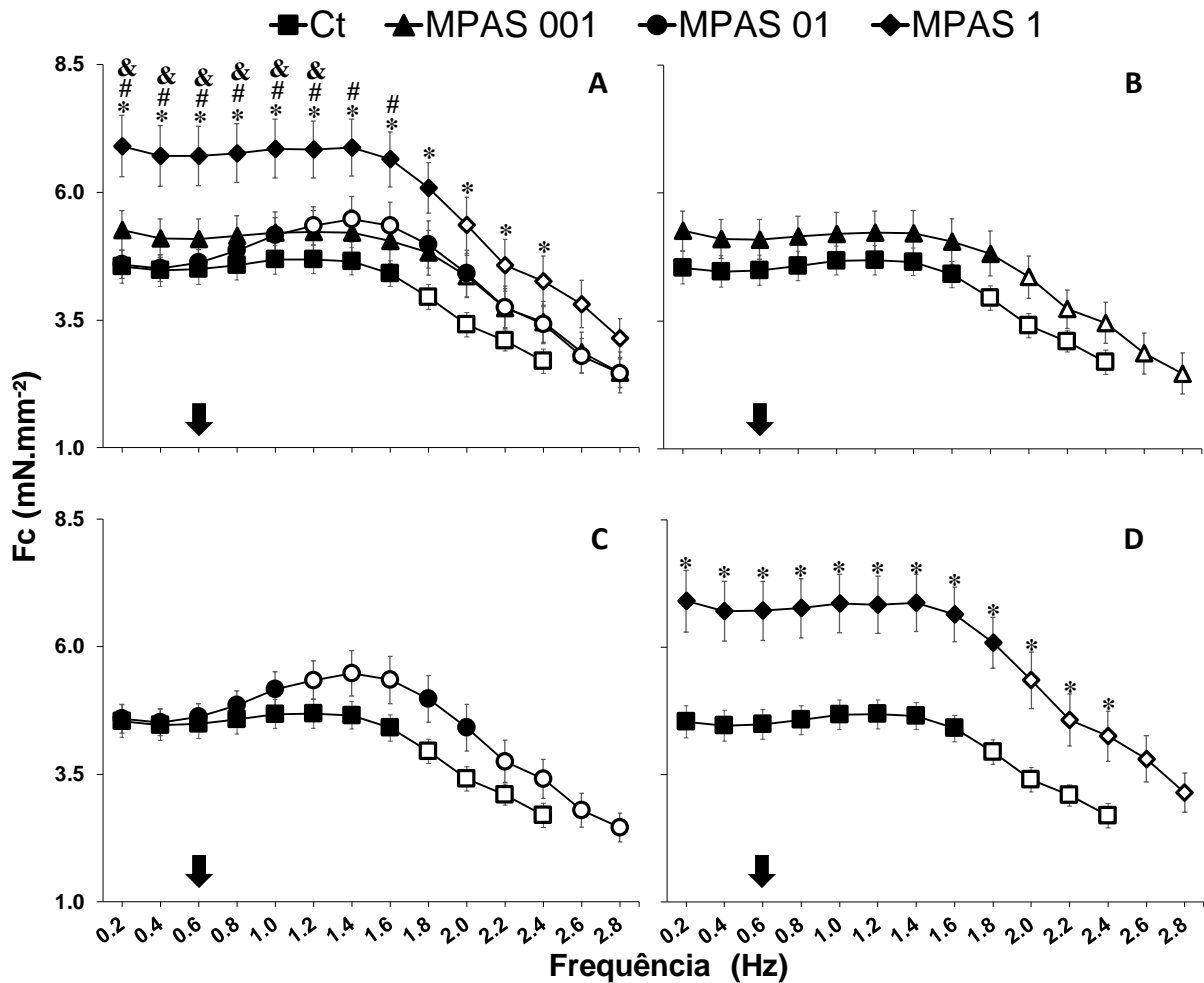
Para o grupo controle, houve uma redução significativa da  $F_c$  em relação aos valores iniciais (0,2 Hz), a partir da frequência de estimulação de 1,8 Hz. Acima de 1,8 Hz ocorreu uma diminuição progressiva da  $F_c$ , cujo valor mínimo observado foi de 2,69 mN.mm<sup>-2</sup> na frequência de 2,4 Hz, onde os registros tornaram-se irregulares. O

grupo MPAS 001 apresentou uma redução significativa da Fc a partir de 2,0 Hz, atingindo o valor mínimo de 2,47 mN.mm<sup>-2</sup> na frequência de estimulação de 2,8 Hz. Por outro lado, o grupo MPAS 01 exibiu um aumento da Fc entre 1,2 Hz à 1,6 Hz, apresentando, graficamente, um comportamento de sino. A redução da sua Fc ocorreu a partir de 2,2 Hz, atingindo o valor mínimo de 2,45 mN.mm<sup>-2</sup> na frequência de 2,8 Hz. O grupo MPAS 1 apresentou uma redução significativa da Fc a partir de 2,0 Hz, atingindo o valor mínimo de 3,14 mN.mm<sup>-2</sup> na frequência de 2,8 Hz.

Os valores de Fc do grupo MPAS 1 foram, em média, 34% superiores ao controle em todas as frequências de estimulação avaliadas. Os valores de Fc do grupo MPAS 1 foram superiores, ainda, em relação aos grupos MPAS 001 e MPAS 01. Quando comparado ao grupo MPAS 001, os valores de Fc de MPAS 1 foram 24% superiores na faixa de 0,2 Hz à 1,6 Hz, e, quando comparado ao grupo MPAS 01 os valores de Fc foram 29% superiores nas faixas de 0,2 Hz à 1,2 Hz.



**Figura 29** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no desenvolvimento de força das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do aumento da frequência de estimulação sobre a força de contração ( $F_c$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

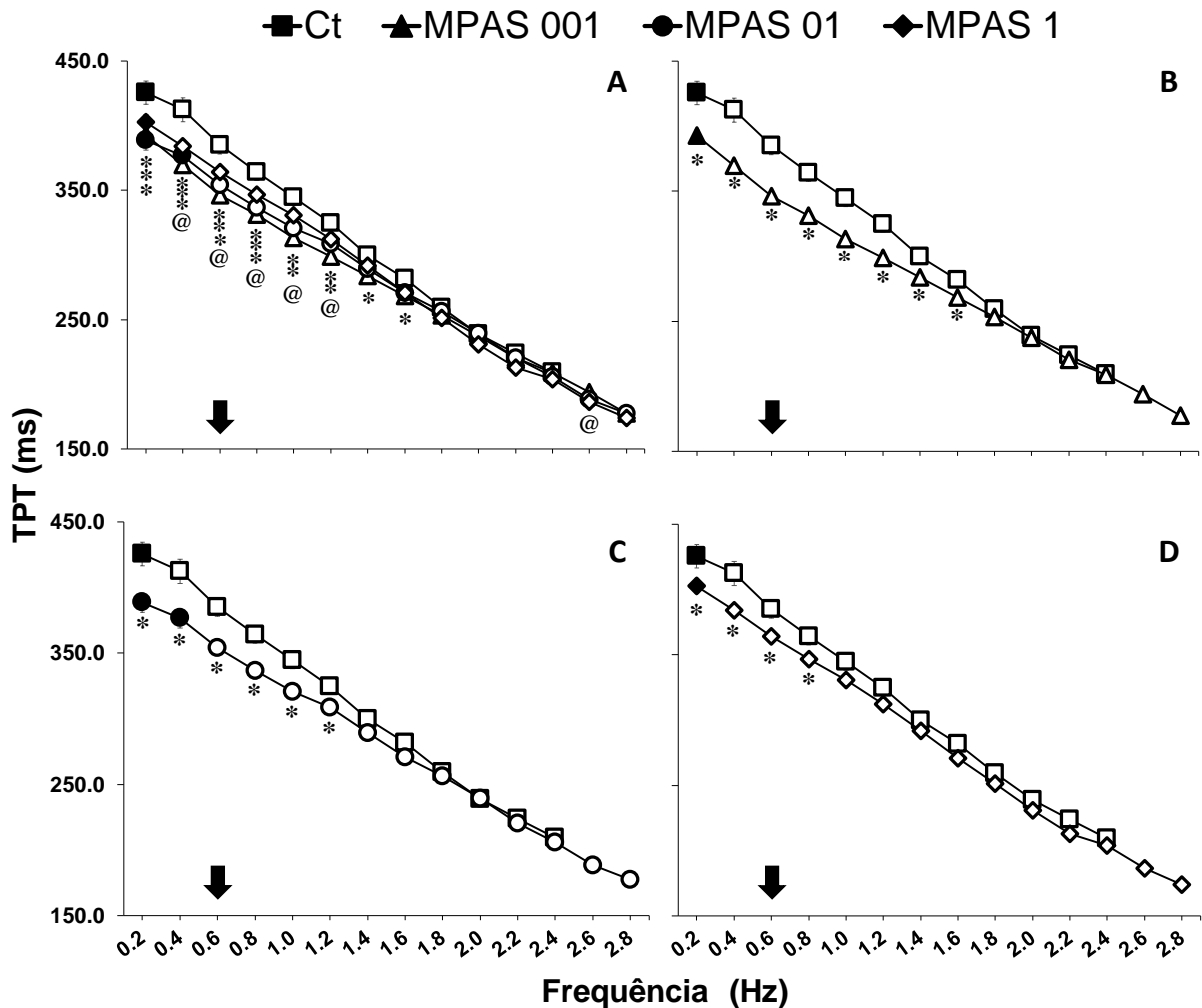
Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão (TPT – “*time to peak tension*”) estão representados graficamente na figura 30.

Os valores de TPT indicam que para o grupo controle, houve uma redução significativa dos valores de TPT a partir da frequência de estimulação de 0,4 Hz, sendo que o valor mínimo observado foi de 209 ms na frequência de 2,4 Hz, onde os registros tornaram-se irregulares. O grupo MPAS 001 apresentou uma redução significativa dos valores de TPT a partir de 0,4 Hz e o valor mínimo observado foi de 177 ms na

frequência de 2,8 Hz. O grupo MPAS 01 mostrou redução significativa dos valores de TPT a partir de 0,6 Hz, sendo que o valor mínimo observado foi de 177 ms na frequência de 2,8 Hz. Para o grupo MPAS 1, os valores de TPT sofreram uma redução significativa a partir de 0,4 Hz, com um valor mínimo observado de 174 ms na frequência de 2,8 Hz.

Os valores de TPT do grupo MPAS 001 foram 8% inferiores em relação ao controle nas frequências de 0,2 Hz a 1,6 Hz. Para o grupo MPAS 01, ocorreu uma redução de 7% em relação ao controle nas frequências de 0,2 Hz a 1,2 Hz. Por fim, o grupo MPAS 1 apresentou uma redução dos valores de TPT na ordem de 5% comparadas ao controle, nas frequências de 0,2 Hz a 1,2 Hz. Ao comparar o grupo MPAS 001 e MPAS 1, foi observado uma redução significativa de 5% dos valores de TPT nas frequências de 0,4 Hz a 1,2 Hz do grupo MPAS 001.

**Figura 30** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para o pico de tensão (TPT – ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações (n = 10 para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle. @ indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 1. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

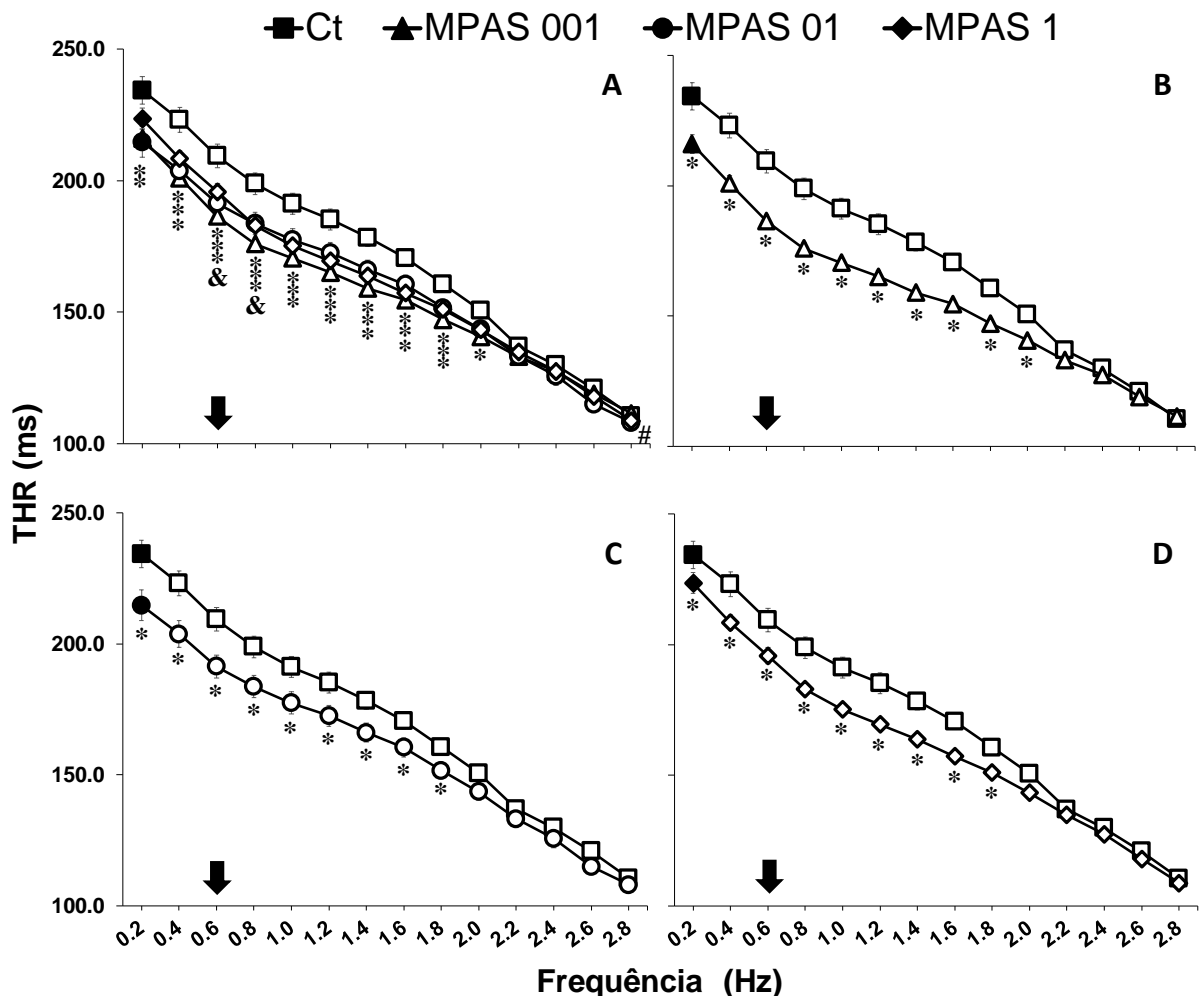
Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação no tempo para 50% do relaxamento (THR – “*time to half relaxation*”) estão representados graficamente na figura 31.

Em todos os grupos experimentais, a partir da frequência de estimulação de 0,4 Hz, ocorreu uma redução significativa dos valores de THR. Para o grupo controle, o menor valor observado de THR foi de 110 ms na frequência de 2,8 Hz. O valor mínimo obtido pelo grupo MPAS 001 foi de 111 ms, na frequência de 2,8 Hz. Os

grupos MPAS 01 e MPAS 1 obtiveram os mesmos valores mínimos, sendo 108 ms, na frequência de 2,8 Hz. O grupo MPAS 001 obteve valores de THR 10% inferiores ao controle, sendo significativamente inferior nas frequências de 0,2 Hz a 2,0 Hz.

Os valores de THR do grupo MPAS 01 foram 7% inferiores ao controle, nas frequências de 0,2 Hz a 2,0 Hz. E, para o grupo MPAS 1, os valores de THR foram 8% inferiores em comparação ao controle, nas frequências de 0,4 Hz a 1,8 Hz. Ao comparar o grupo MPAS 001 e MPAS 01, nas frequências de 0,6 Hz e 0,8 Hz, os valores de THR do grupo MPAS 001 foram 3% inferiores.

**Figura 31** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação no tempo para 50% do relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



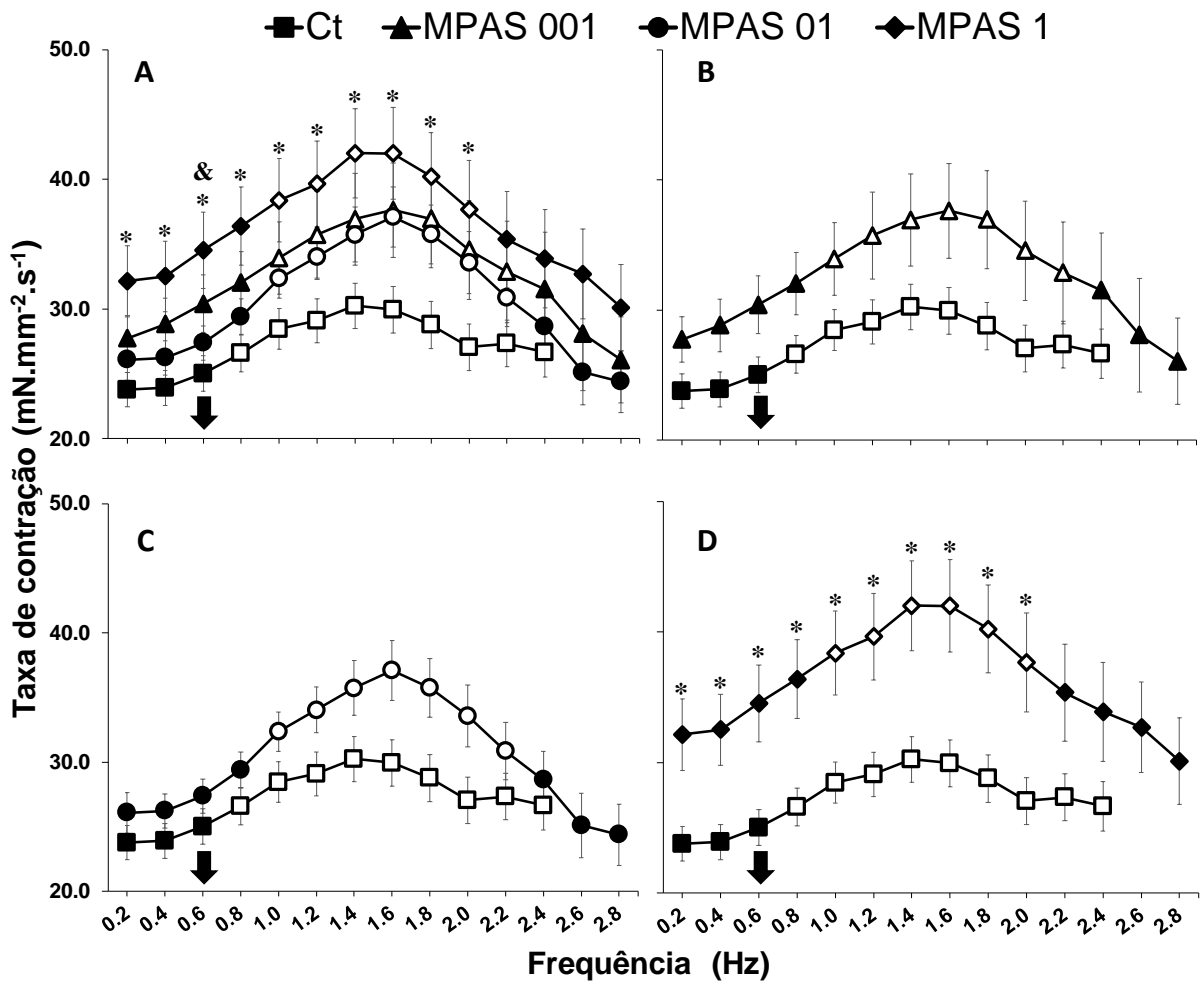
Efeito do aumento da frequência de estimulação no tempo para 50% de relaxamento (THR – ms) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações (n = 10 para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle. & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação na taxa de contração ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 32.

O grupo controle exibiu um aumento significativo da taxa de contração a partir de 0,8 Hz, atingindo um valor máximo de  $26 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  na frequência de 2,4 Hz. Os grupos MPAS 001 e MPAS 01 exibiram aumentos significativos na taxa de contração nas frequências de 1,0 Hz à 2,2 H. Para o grupo MPAS 1, o aumento significativo ocorreu nas frequências de 1,0 Hz à 2,0 Hz e o valor mínimo observado de  $30 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  na frequência de 2,8 Hz.

Em média, o grupo MPAS 1 apresentou um aumento significativo da taxa de contração de aproximadamente 27%, nas frequências de 0,2 Hz a 2,0 Hz, quando comparado ao grupo controle. Em relação ao grupo MPAS 01, o valor da taxa de contração do grupo MPAS 1 foi 9% superior na frequência de 0,6 Hz.

**Figura 32** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na taxa de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do aumento da frequência de estimulação na taxa de contração ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{ms}^{-1}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto a MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0.05$ ). & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

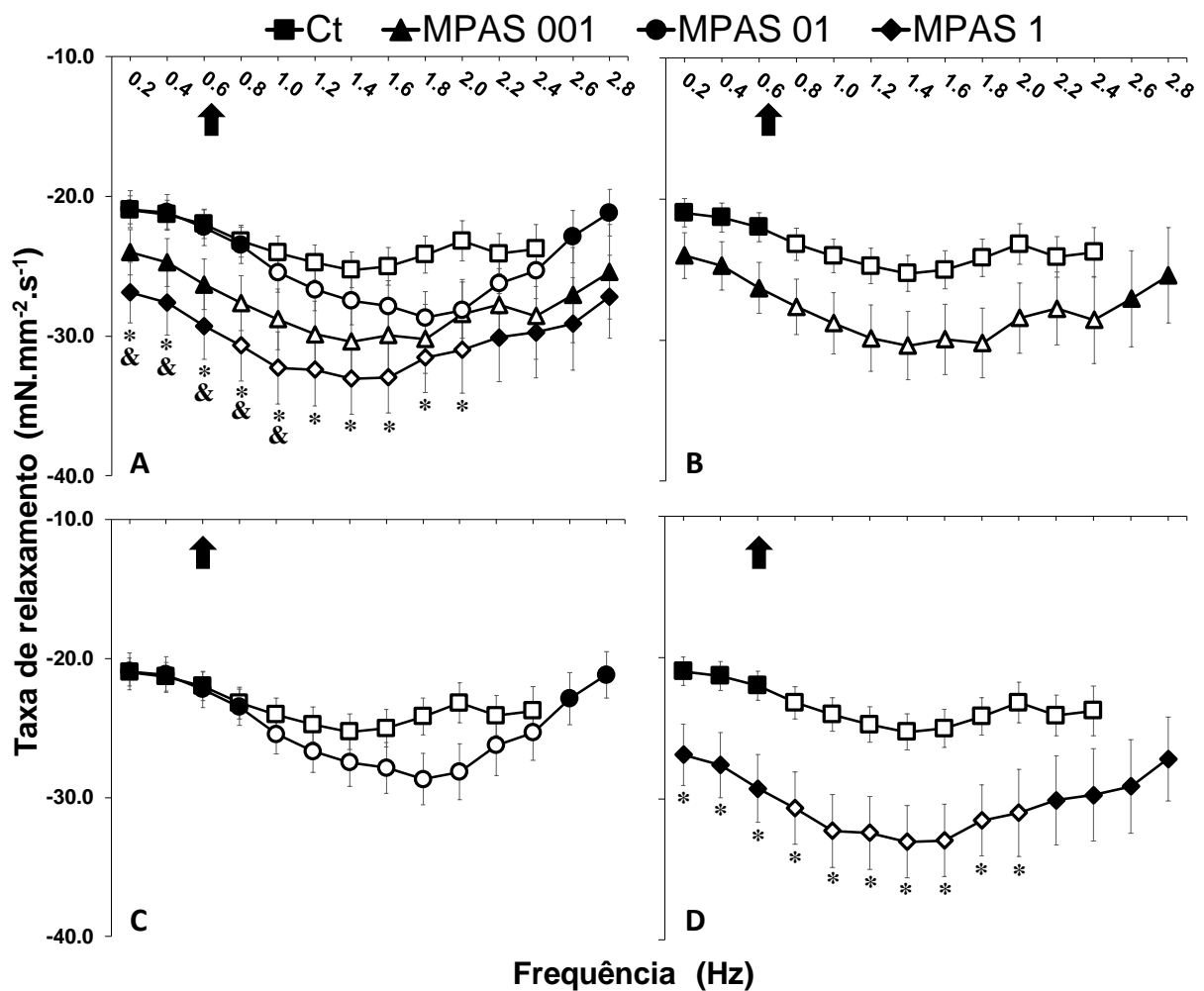
Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação na taxa de relaxamento ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 33.

O grupo controle mostrou a menor taxa de relaxamento entre os grupos, com um aumento significativo deste parâmetro a partir da frequência de estimulação de 0,8 Hz, cujo valor máximo observado foi de -23 ms na frequência de 2,4 Hz. O grupo MPAS 001 passou a ter um aumento significativo a partir de 0,8 Hz até 2,6 Hz,

enquanto o grupo MPAS 01 exibiu um aumento significativo de 1,0 Hz a 2,4 Hz. O grupo MPAS 1 apresentou um aumento significativo de 0,8 Hz a 2,0 Hz.

A taxa de relaxamento do grupo MPAS 1 foi significativamente superior ao controle, mostrando um aumento de 24% nas frequências de 0,2 Hz a 2,0 Hz. Quando comparado com o grupo MPAS 01, a taxa de relaxamento do grupo MPAS 1 foi 23% superior nas frequências de 0,2 Hz a 1,0 Hz.

**Figura 33** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na taxa de relaxamento das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Efeito do aumento da frequência de estimulação na taxa de relaxamento ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{ms}^{-1}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

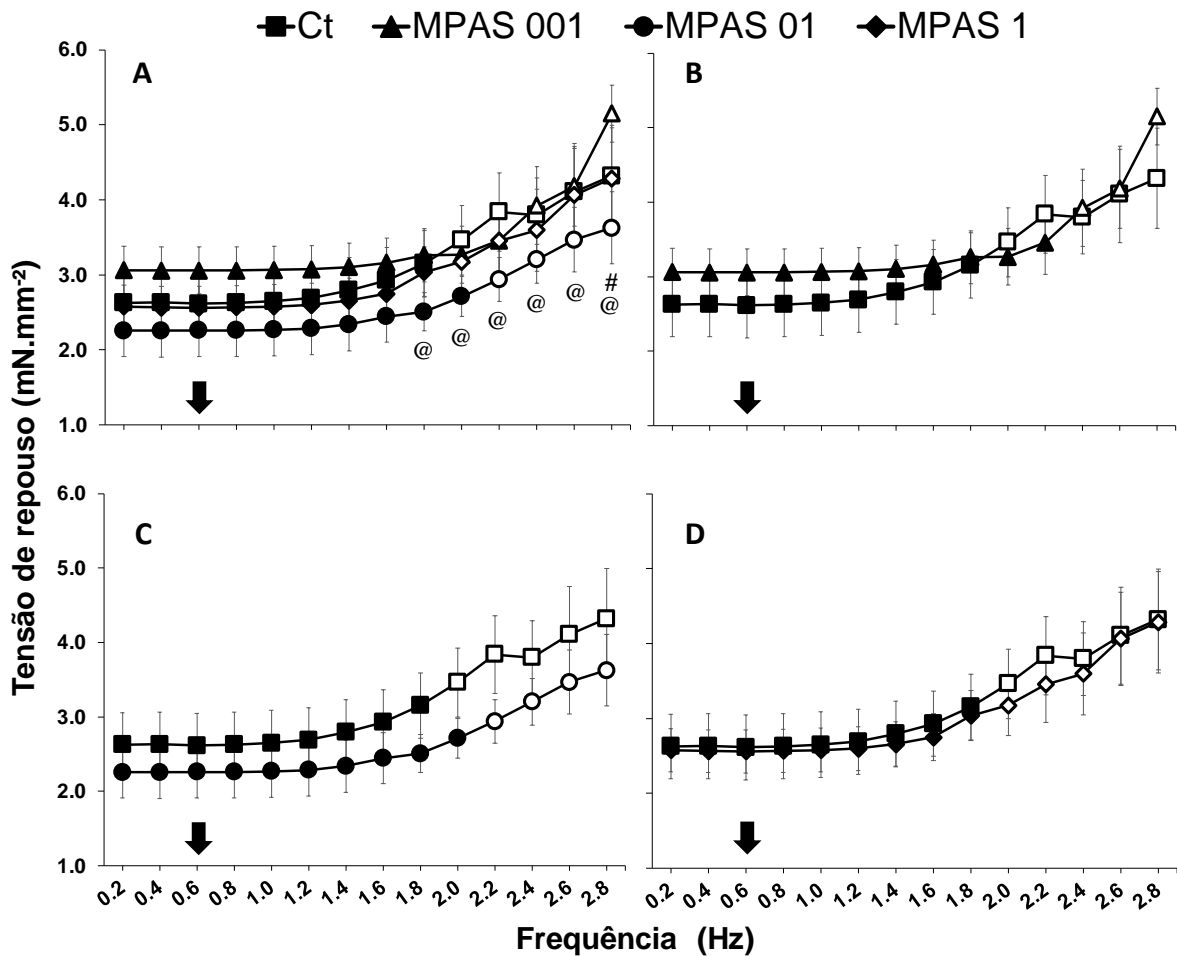
Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação na tensão de repouso ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 34.

Os valores de tensão de repouso do grupo controle foram significativamente superiores a frequência inicial (0,2 Hz) a partir da frequência de estimulação de 2,0 Hz, atingindo o valor máximo de  $4,32 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na frequência de 2,8 Hz, onde os registros tornaram-se irregulares. O grupo MPAS 001 exibiu um aumento significativo a partir de 2,4 Hz, com um valor máximo de  $5,15 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na frequência de 2,8 Hz. O grupo MPAS 01, por sua vez, apresentou um aumento significativo dos valores de tensão de repouso a partir da frequência de 2,2 Hz, atingindo o valor máximo de  $3,63 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na frequência de 2,8 Hz. Por fim, o grupo MPAS 1 exibiu um aumento significativo a partir de 2,0 Hz, com valor máximo de  $4,29 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$  na frequência de 2,8 Hz.

O grupo MPAS 1, nas frequências de 1,8 Hz a 2,8 Hz, apresentou valores de tensão de repouso 15% inferiores em relação ao grupo MPAS 01. Na última frequência avaliada, de 2,8 Hz, o grupo MPAS 01 exibiu uma redução de 27% da tensão de repouso quando comparado ao grupo MPAS 001.



**Figura 34** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na tensão de repouso das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



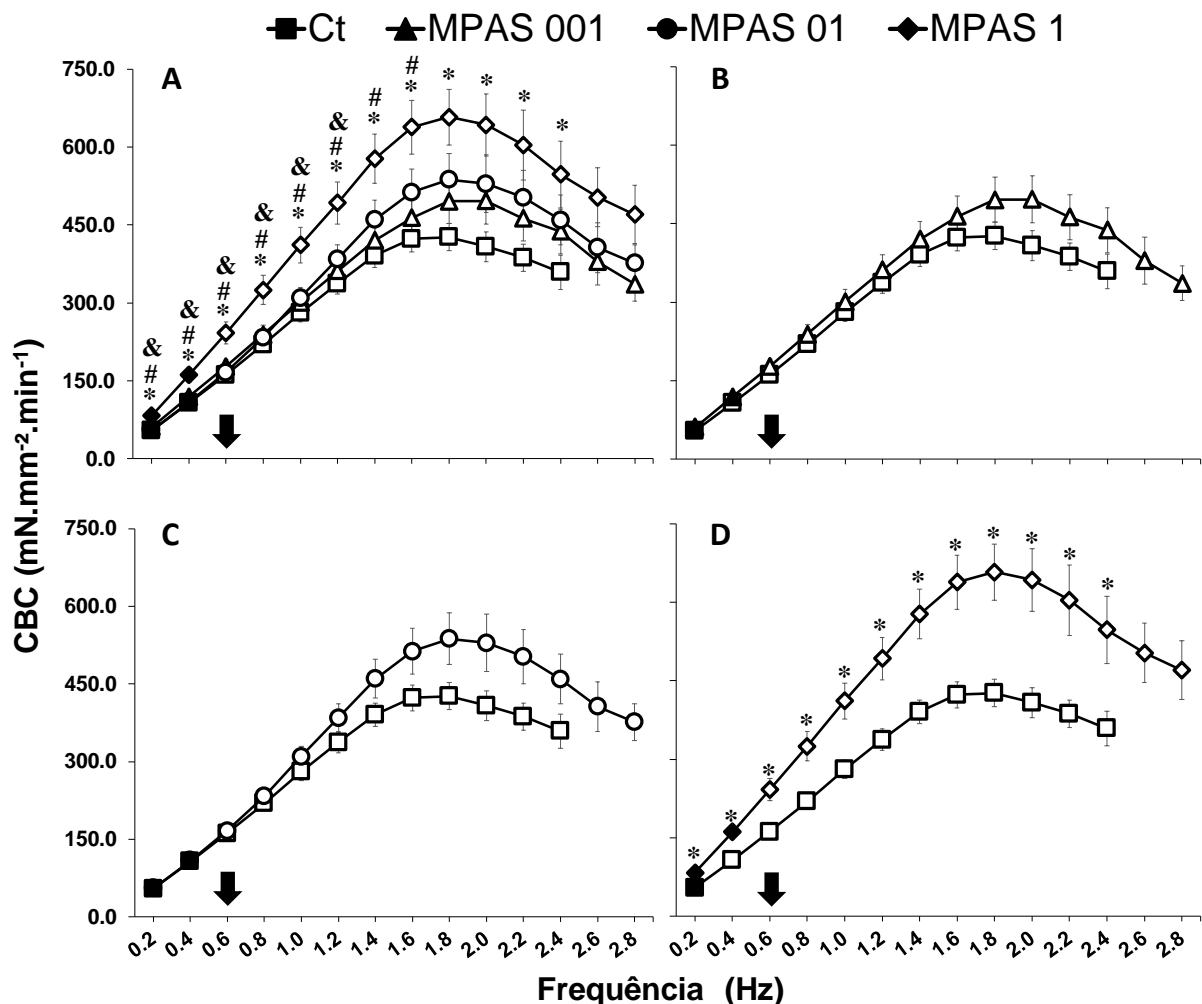
Efeito do aumento da frequência de estimulação na tensão de repouso (mN/mm<sup>2</sup>) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). @ indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 1. # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Os efeitos do incremento gradual na frequência de estimulação na capacidade de bombeamento cardíaco (CBC – mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>) das tiras ventriculares de *O. niloticus* estão representados graficamente na figura 35.

Os valores indicam que todos os grupos experimentais obtiveram um aumento significativo dos valores de CBC a partir da frequência de estimulação de 0,6 Hz. O valor máximo atingido pelo grupo controle foi de 423 mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup> na frequência de 1,8 Hz, com um valor de 359 mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>. O grupo MPAS 001 atingiu o valor máximo de 495 mN.mm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup> na frequência de 2,0 Hz. O grupo MPAS 01 atingiu o

valor máximo de  $537 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  na frequência de 1,8 Hz e, por fim, o grupo MPAS 1 atingiu seu valor máximo de CBC na frequência de 1,8 Hz, com um valor de  $657 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ . Em média, os valores de CBC do grupo MPAS 1 foram significativamente superiores aos demais grupos. Comparado com o controle, de 0,2 Hz a 2,4 Hz, a CBC do grupo MPAS 1 foi 34% superior. Ao comparar com o grupo MPAS 001, nas faixas de 0,2 Hz a 1,6 Hz, o grupo MPAS 1 exibiu valores de CBC 27% superiores. E, por fim, ao comparar com o grupo MPAS 01, nas faixas de 0,2 Hz a 1,2 Hz, o grupo MPAS 1 mostrou valores de CBC 29% superiores.

**Figura 35** - Efeito do incremento gradual na frequência de estimulação na capacidade de bombeamento cardíaco das tiras ventriculares dos grupos controle e expostos



Capacidade de bombeamento cardíaco (CBC –  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{ms}^{-1}$ ) de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle ( $n = 10$ ) e exposto ao MPAS em diferentes concentrações ( $n = 10$  para cada grupo exposto). A seta preta na frequência 0,6 Hz indica a frequência cardíaca de *O. niloticus* observada *in vivo*. Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). # indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 001. & indica diferença significativa em relação ao grupo MPAS 01.

01. **A)** Comparação entre grupo controle e todos os grupos expostos. **B)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 001. **C)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 01. **D)** Comparação entre grupo controle e grupo MPAS 1. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.3.3 Tensão de repouso e porcentagem de alteração da força de contração

Os valores médios da porcentagem de alteração da Fc do grupo controle passaram a ter reduções significativas em relação aos valores iniciais, de 0,2 Hz, a partir da frequência de estimulação de 1,6 Hz. As figuras 36, 37 e 38 apresentam graficamente os valores de porcentagem de alteração da Fc em relação a 0,2 Hz.

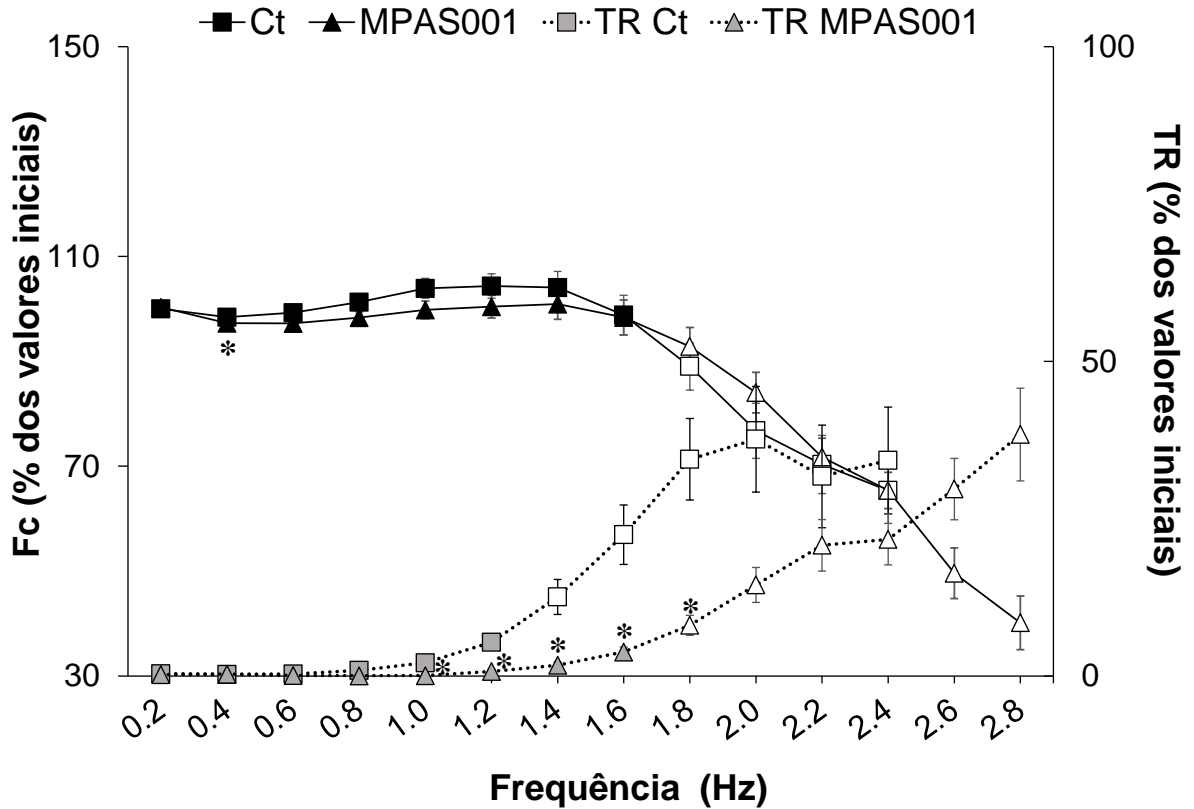
Da mesma forma, os valores médios da porcentagem de alteração da tensão de repouso (TR) do grupo controle passaram a ter aumentos significativos em relação aos valores iniciais de 0,2 Hz a partir da frequência de estimulação de 1,4 Hz. As figuras 36, 37 e 38 apresentam graficamente os valores médios da porcentagem de alteração da TR em relação a 0,2 Hz.

Ao comparar os valores da porcentagem de alteração da Fc do grupo controle e MPAS 001 (Figura 36), é possível observar que o grupo exposto MPAS 001 obteve reduções significativas a partir de 1,6 Hz, seguindo o mesmo padrão do grupo controle. Para os valores médios da porcentagem de alteração da TR (Figura 36), o grupo exposto MPAS 001 exibiu aumento significativo somente a partir de 1,8 Hz. Comparado ao controle, esse grupo apresentou uma menor alteração dos valores médios de alteração da porcentagem da TR em comparação ao grupo controle, principalmente na faixa de 1,0 Hz a 1,8 Hz, indicando que a alteração da TR do grupo controle nessa faixa de frequências foi maior.

Para o grupo MPAS 01 os valores médios de porcentagem de alteração da Fc (Figura 37) apresentaram um aumento significativo na faixa de 0,6 Hz a 2,0 Hz, ao comparar com seus valores iniciais de 0,2 Hz. Este aumento foi superior a alteração do grupo controle na mesma faixa de frequência. Os valores médios de porcentagem de alteração da TR do grupo MPAS 01 (Figura 37) foram menores a partir de 1,8 Hz quando comparados aos valores iniciais de 0,2 Hz.

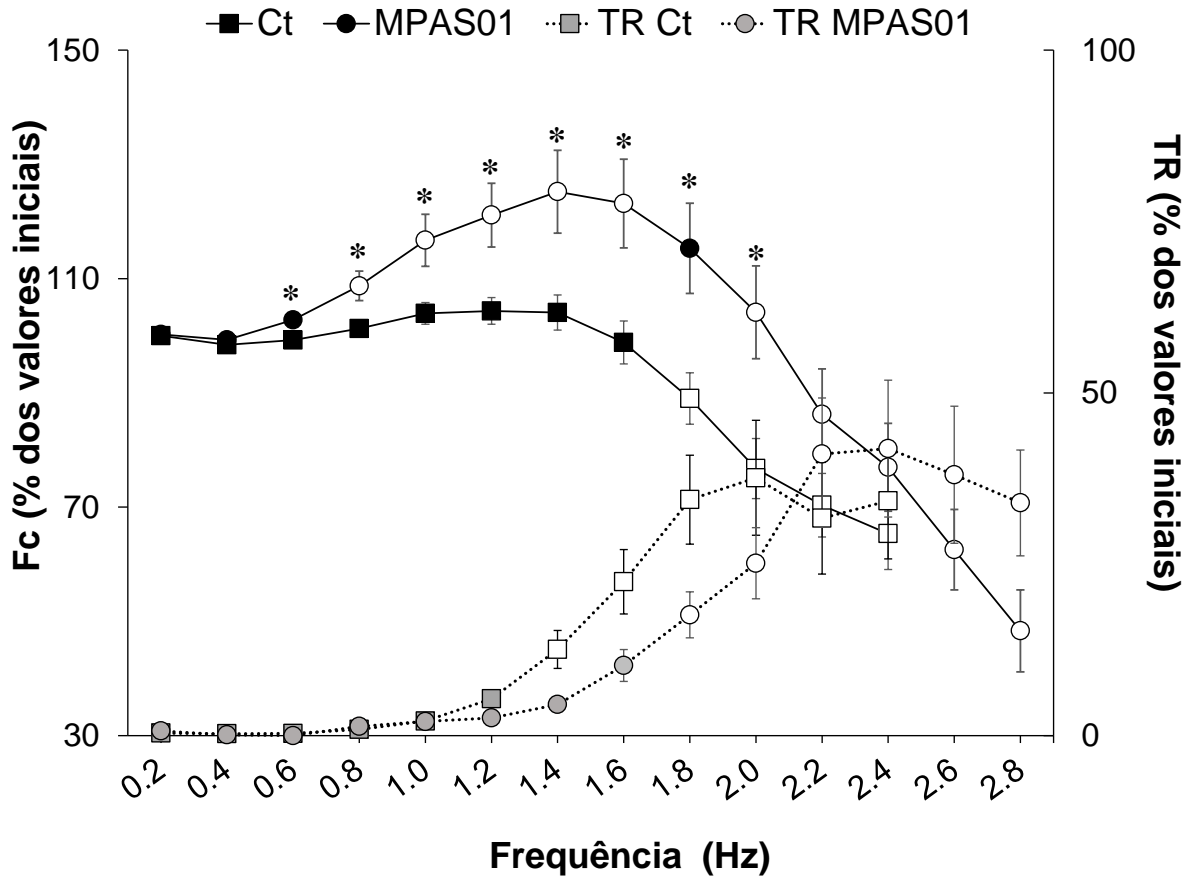
Por fim, os valores médios de porcentagem de alteração da Fc do grupo MPAS 1 (Figura 38) diminuíram significativamente a partir de 2,0 Hz ao se comparar com os valores iniciais de 0,2 Hz. Os valores médios de porcentagem de alteração da TR do grupo MPAS 1 (Figura 38) aumentaram significativamente em relação a 0,2 Hz apenas nas frequências de 1,2 Hz e 1,4 Hz, no entanto essa alteração em relação a 0,2 Hz ainda foi menor que a do grupo controle.

**Figura 36** - Força de contração e Tensão de repouso em relação a valores iniciais dos grupos controle e MPAS 001



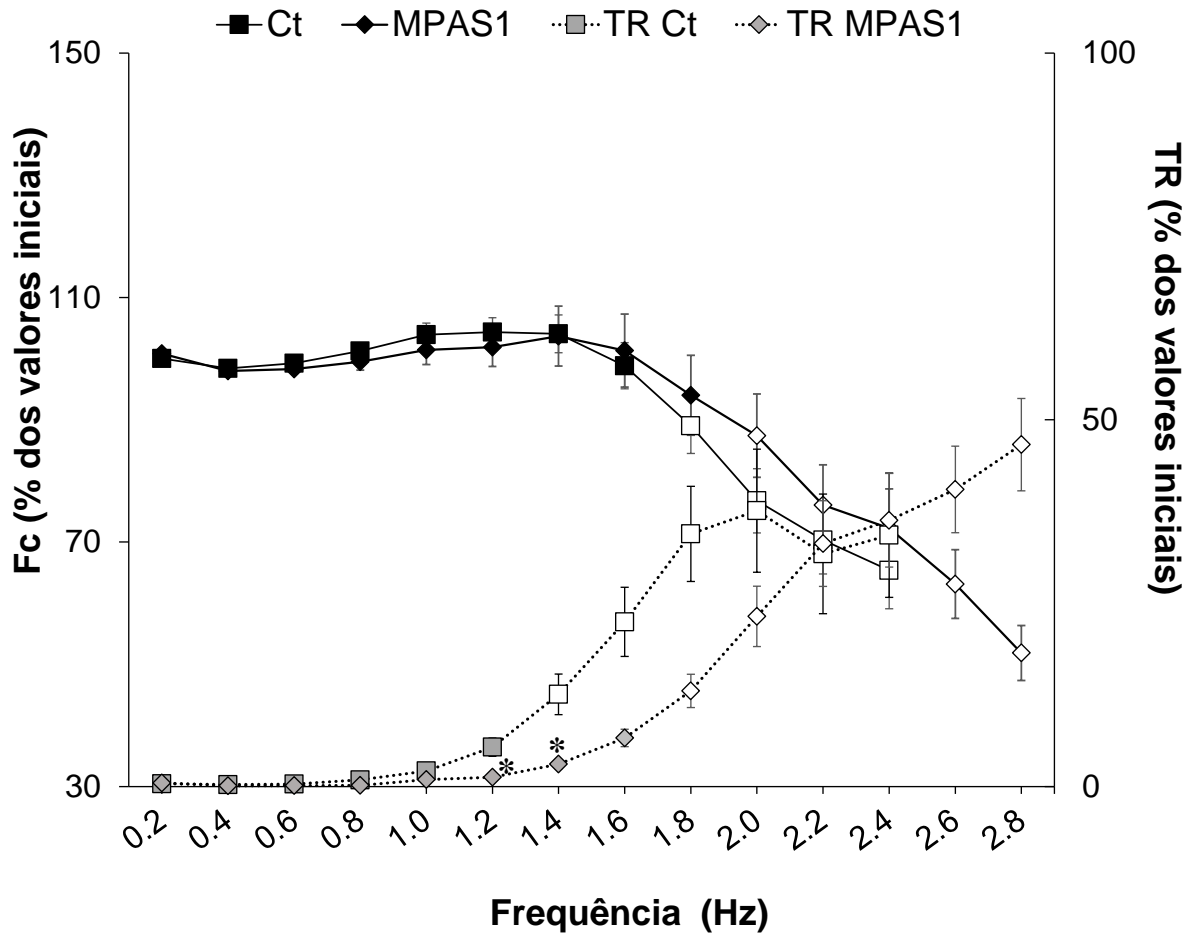
Porcentagem de alteração da tensão de repouso e força de contração em frequências superiores à 0,2 Hz de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto MPAS 001, 0,01 g.L<sup>-1</sup> (n = 10 para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05). **Fonte:** elaborado pelo autor.

**Figura 37-** Força de contração e Tensão de repouso em relação a valores iniciais dos grupos controle e MPAS 01



Porcentagem de alteração da tensão de repouso e força de contração em frequências superiores à 0,2 Hz de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto MPAS 01, 0,1 g.L<sup>-1</sup> (n = 10 para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05).  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Figura 38** - Força de contração e Tensão de repouso em relação a valores iniciais dos grupos controle e MPAS 1



Porcentagem de alteração da tensão de repouso e força de contração em frequências superiores à 0,2 Hz de tiras ventriculares de *O. niloticus*, dos grupos controle (n = 10) e exposto MPAS 1, 1,0 g.L<sup>-1</sup> (n = 10 para cada grupo exposto). Símbolos abertos indicam diferença significativa em relação aos valores iniciais (0,2 Hz). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle (P < 0,05).  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

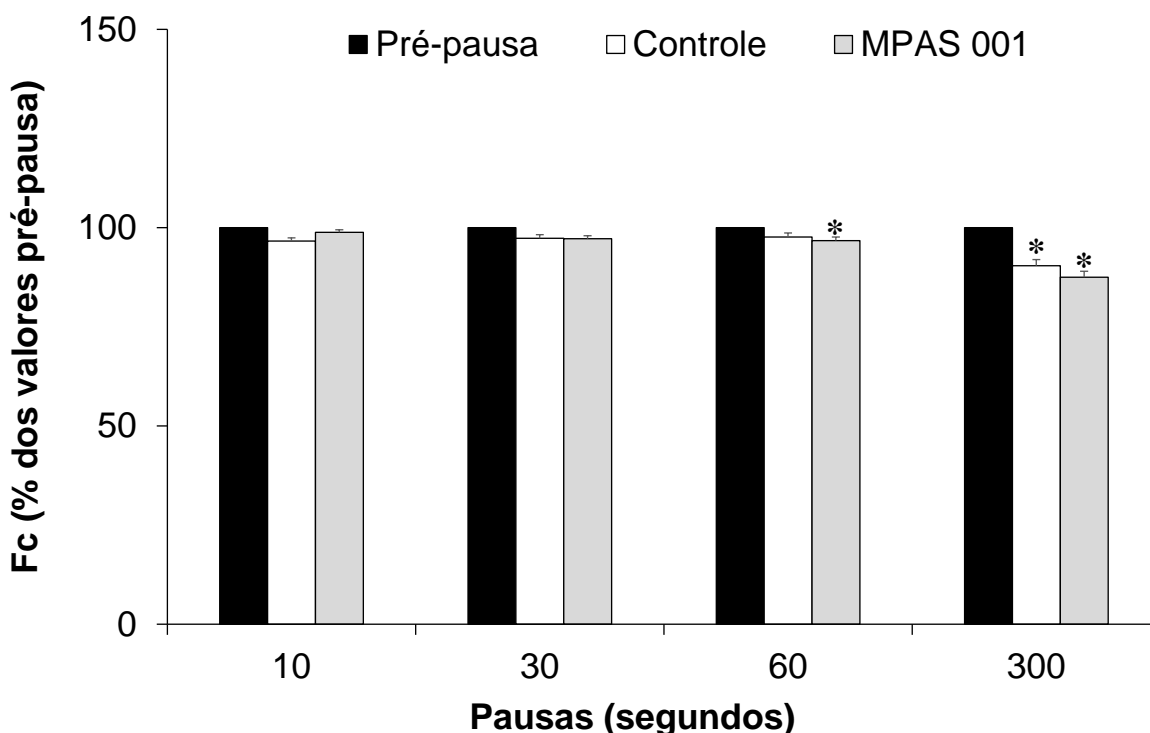
#### 4.3.4 Potenciação pós-pausa (Força de contração)

Os valores do efeito da potenciação pós-pausa estão graficamente representados na figura 39, 40 e 41. Após pausas (10, 30, 60 e 300 segundos) na estimulação elétrica, foram registrados os valores de Fc.

O efeito das pausas na estimulação elétrica resultou em um decaimento significativo da Fc apenas na pausa de 300 segundos nos animais controles. A Fc pós-pausa, em 300 segundos no grupo controle, foi 9,7% menor em relação ao registro pré-pausa (Figuras 39, 40 e 41).

O grupo exposto MPAS 001 exibiu valores de Fc menores no pós-pausa em 60 e 300 segundos. A redução da Fc em 60 segundos foi de 4,3% e de 12,2% em 300 segundos (Figura 39).

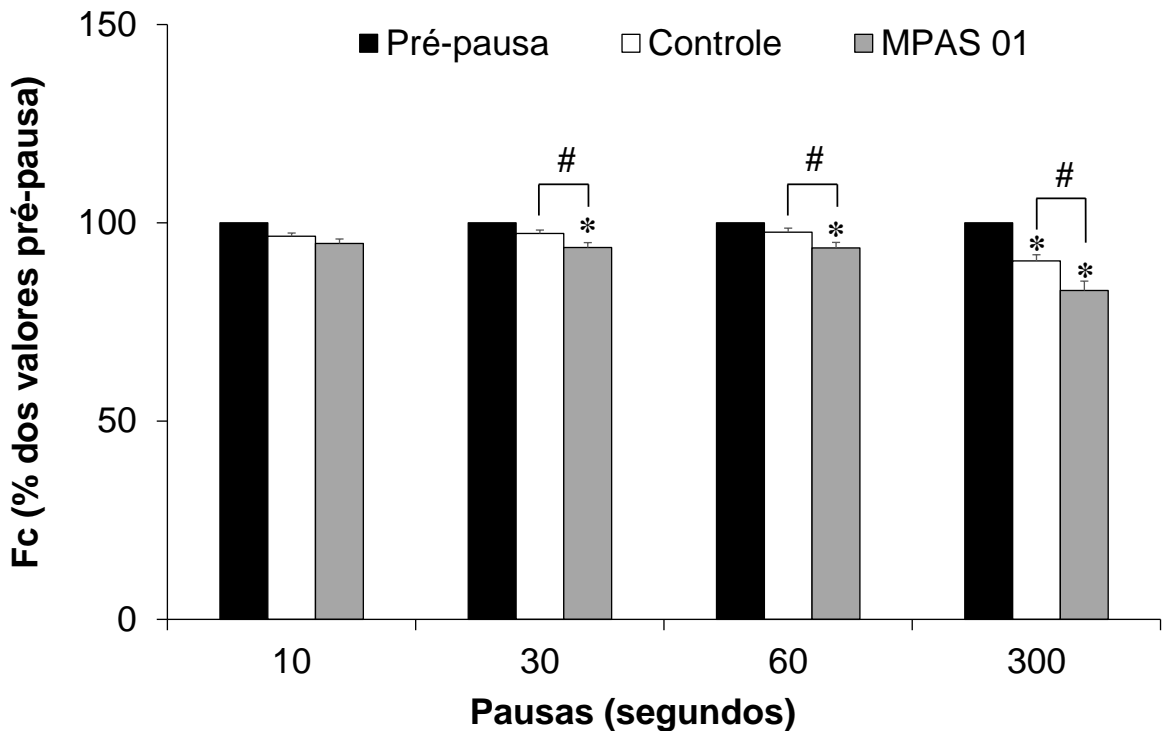
**Figura 39** - Efeito de pausas na estimulação elétrica na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e MPAS 001



Efeito de pausas na estimulação elétrica de 10, 30, 60 e 300 segundos na força de contração de tiras ventriculares de *O. niloticus*, do grupo controle (n = 10) e do grupo exposto MPAS 001 (n = 10). Asteriscos indicam redução significativa ( $P < 0,05$ ) da Fc em relação ao valor de pré-pausa (100%).  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

O grupo exposto MPAS 01 apresentou valores de Fc menores após pausas de 30, 60 e 300 segundos. A redução em 30 segundos foi de 6,2%, em 60 segundos de 6,3% e, por fim, 17% em 300 segundos, em relação aos valores pré-pausa. Quando o comportamento pós-pausa da Fc foi comparado ao grupo controle, diferenças significativas foram registradas. Em 30 segundos a Fc do grupo MPAS 01 foi 4% inferior, em 60 segundos 4% inferior e em 300 segundos 8% inferior aos valores de Fc obtidos no controle (Figura 40).

**Figura 40** - Efeito de pausas na estimulação elétrica na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e MPAS 01

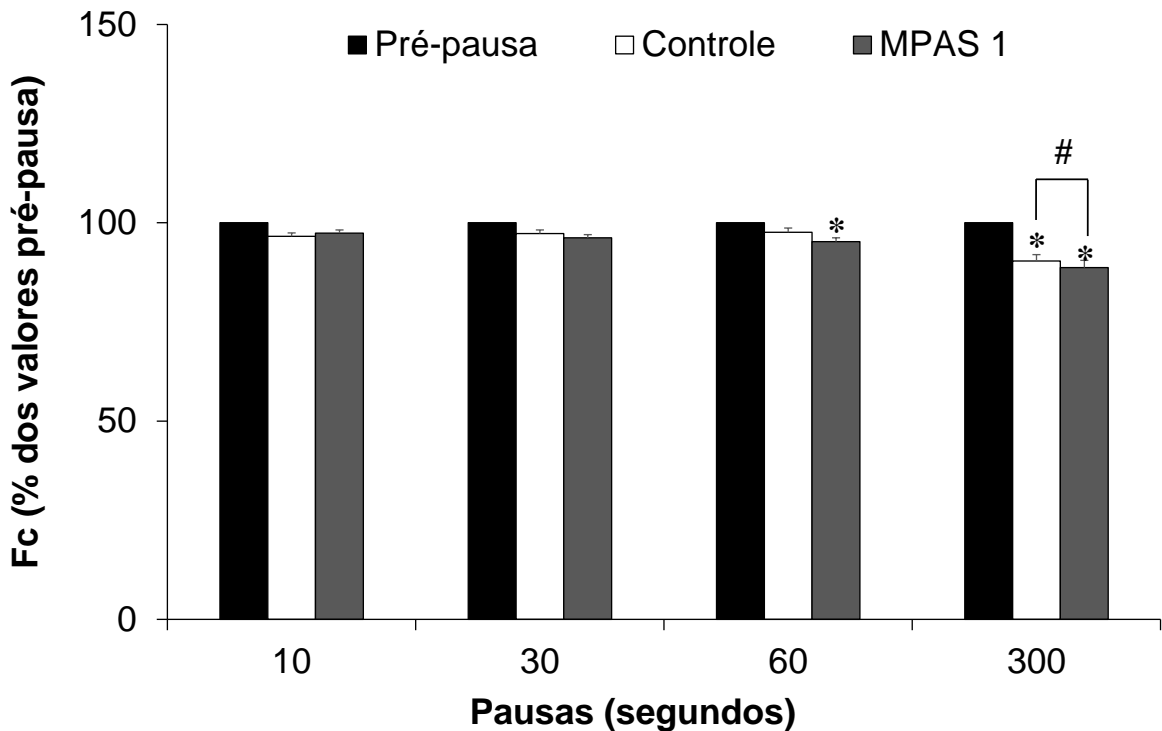


Efeito de pausas na estimulação elétrica de 10, 30, 60 e 300 segundos na força de contração de tiras ventriculares de *O. niloticus*, do grupo controle (n = 10) e do grupo exposto MPAS 01 (n = 10). Asteriscos indicam redução significativa ( $P < 0,05$ ) da Fc em relação ao valor de pré-pausa (100%). # indica diferença significativa em relação ao controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Decaimentos pós-pausa na Fc foram registrados também para o grupo MPAS 1, com reduções na ordem de 6% e 11% para as pausas de 60 e 300 segundos, respectivamente. Quando comparado com o controle, o decaimento pós-pausa da Fc foi significativamente maior na pausa de 300 segundos (Figura 41).



**Figura 41** - Efeito de pausas na estimulação elétrica na força de contração das tiras ventriculares dos grupos controle e MPAS 1



Efeito de pausas na estimulação elétrica de 10, 30, 60 e 300 segundos na força de contração de tiras ventriculares de *O. niloticus*, do grupo controle (n = 10) e do grupo exposto MPAS 1 (n = 10). Asteriscos indicam redução significativa ( $P < 0,05$ ) da Fc em relação ao valor de pré-pausa (100%). # indica diferença significativa em relação ao controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.4 Determinação de parâmetros bioquímicos e biométricos do grupo controle e MPAS 1

Conforme descrito anteriormente no item 3.8 da metodologia, o grupo controle e MPAS 1 (exposto a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS) passaram por uma repetição de exposição (n = 15 para cada grupo) devido aos resultados expressivos exibidos pelo grupo MPAS 1 nos experimentos de contratilidade cardíaca *ex vivo* (seção descrita no item 4.3 dos resultados).

##### 4.4.1 Índices organo-somáticos dos animais dos grupos controle e MPAS 1

Os parâmetros biométricos estão apresentados na tabela 2 e os valores médios da massa ventricular relativa (MVR) e do índice hepatossomático (IHS) estão representados graficamente nas figuras 42 e 43. O índice hepatossomático (IHS) e a massa ventricular relativa (MVR) do grupo MPAS 1 foram significativamente

superiores (27% e 16%, respectivamente) em relação ao grupo controle. O fator de condição (K) não apresentou diferença significativa entre os grupos.

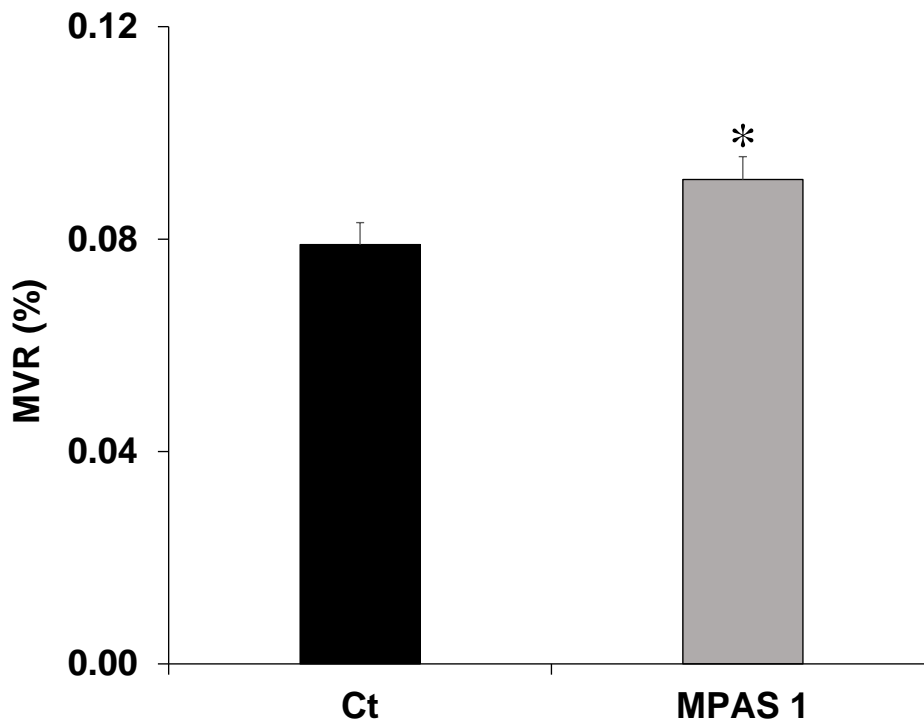
**Tabela 2** - Parâmetros biométricos de tilápias do grupo controle e exposto ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Os valores são médias ± EPM.

| Parâmetros biométricos                     | Grupos experimentais |                 |
|--|----------------------|-----------------|
|  | Ct                   | MPAS 1          |
| Comprimento total (cm)                     | 15,066 ± 0,236       | 13,413 ± 0,429  |
| Massa corporal (g)                         | 55,493 ± 2,916       | 39,273 ± 3,339  |
| Massa hepática (g)                         | 0,437 ± 0,038        | 0,398 ± 0,544   |
| IHS (%)                                    | 0,782 ± 0,061        | 0,997 ± 0,081 * |
| MVR (%)                                    | 0,079 ± 0,004        | 0,091 ± 0,004 * |
| Fator de condição (K, g.cm <sup>-3</sup> ) | 1,602 ± 0,030        | 1,733 ± 0,208   |

Médias do comprimento total (cm), massa corporal (g), massa hepática (g), índice hepatossomático (IHS), massa ventricular relativa (MVR) e fator de condição (K) dos animais controle e expostos ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A MVR no grupo exposto ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> foi 16% maior que o grupo controle, conforme apresentado pela figura 42.

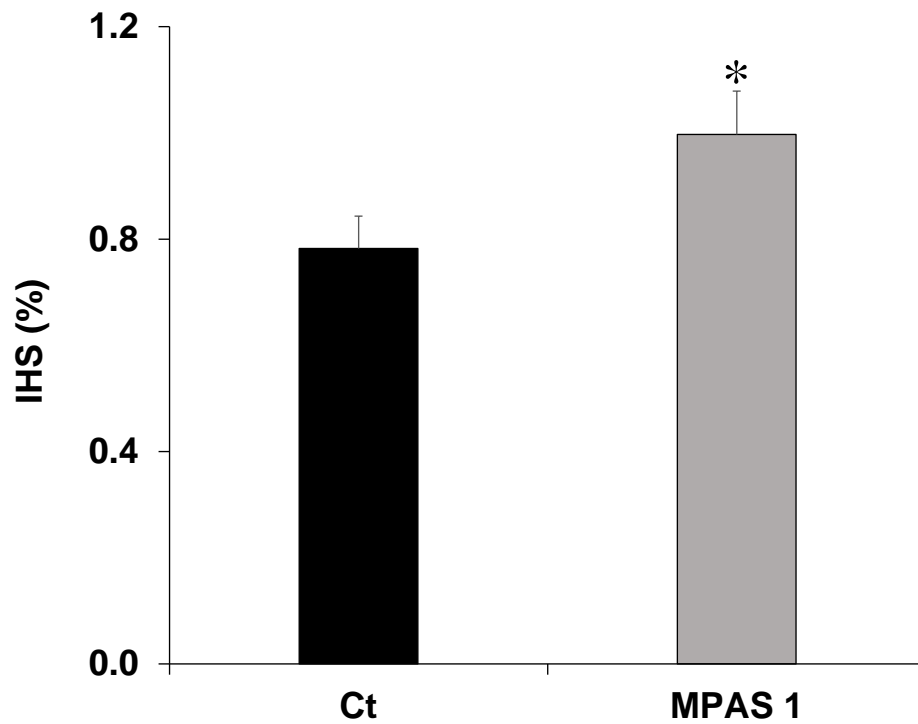
**Figura 42** - Massa Ventricular Relativa (MVR) dos grupos controle e MPAS 1



Índice de massa ventricular relativa dos grupos controle e exposto ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

O IHS no grupo exposto ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> foi 27% maior que o grupo controle, conforme apresentado pela figura 43.

**Figura 43** - Índice hepatossomático (IHS) dos grupos controle e MPAS 1

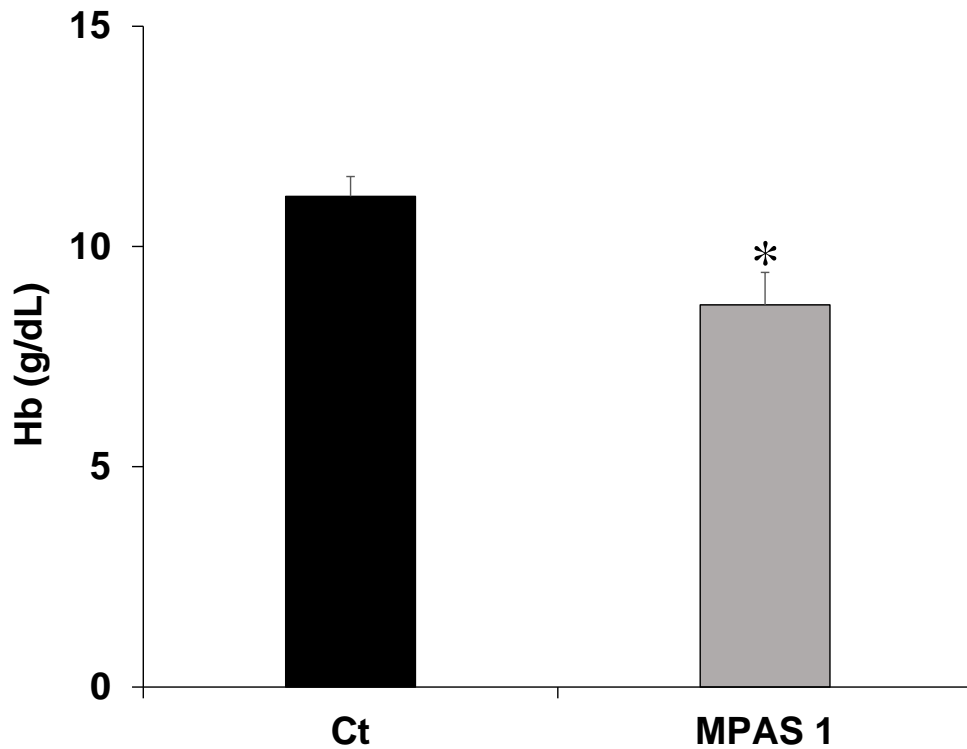


Índice hepatossomático dos grupos controle e exposto ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.4.2 Hemoglobina total

A exposição ao MPAS 1 causou uma redução significativa do conteúdo de Hb de aproximadamente 22% menor em relação ao grupo controle. O valor médio de hemoglobina total do grupo controle foi de 11,14 g/dl e do grupo MPAS 1 foi de 8,68 g/dl. A figura 44 apresenta os valores de hemoglobina dos grupos controle e MPAS 1.

**Figura 44** – Valores médios de hemoglobina total (g/dl) dos grupos controle e MPAS 1

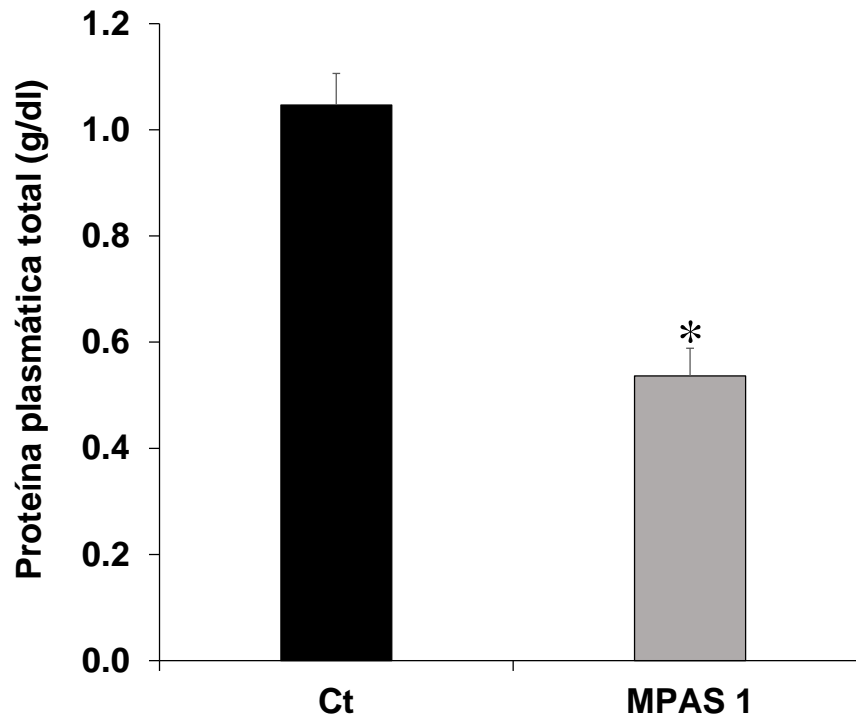


Valores médios da dosagem de hemoglobina total (g/dl) pelo método de Drabkin dos grupos controle e expostos a concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.4.3 Proteína plasmática total

Os valores médios de proteína plasmática do grupo exposto MPAS 1 foram 49% inferiores ao grupo controle. O valor médio de proteína plasmática total do grupo controle foi de  $1,05 \text{ g/dl}$  e do grupo exposto MPAS 1 foi de  $0,54 \text{ g/dl}$ . A figura 45 apresenta os valores médios de proteína plasmática total dos grupos controle e MPAS 1.

**Figura 45** - Valores médio da proteína plasmática total dos grupos controle e MPAS 1

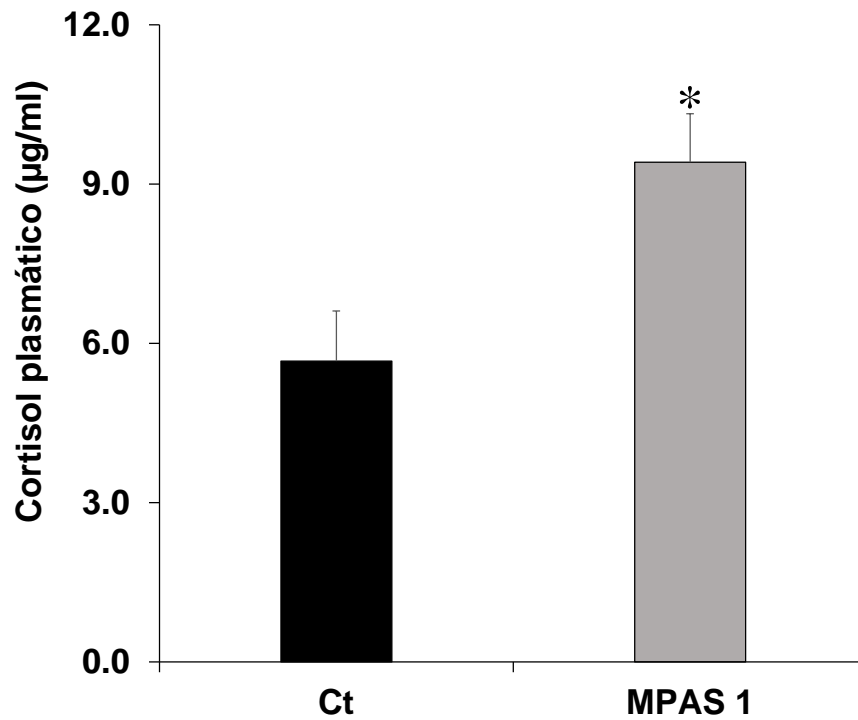


Valores médios da proteína plasmática total dos grupos controle e expostos a concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.4.4 Níveis plasmáticos de cortisol e glicose

O nível de cortisol plasmático no grupo exposto MPAS 1 foi 66% superior ao grupo controle. O valor médio de cortisol plasmático do grupo controle foi  $5,66 \mu\text{g/dl}$  enquanto o grupo exposto MPAS 1 foi  $9,41 \mu\text{g/dl}$ . A figura 46 apresenta os valores médios de cortisol do grupo controle e do grupo MPAS 1 ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ).

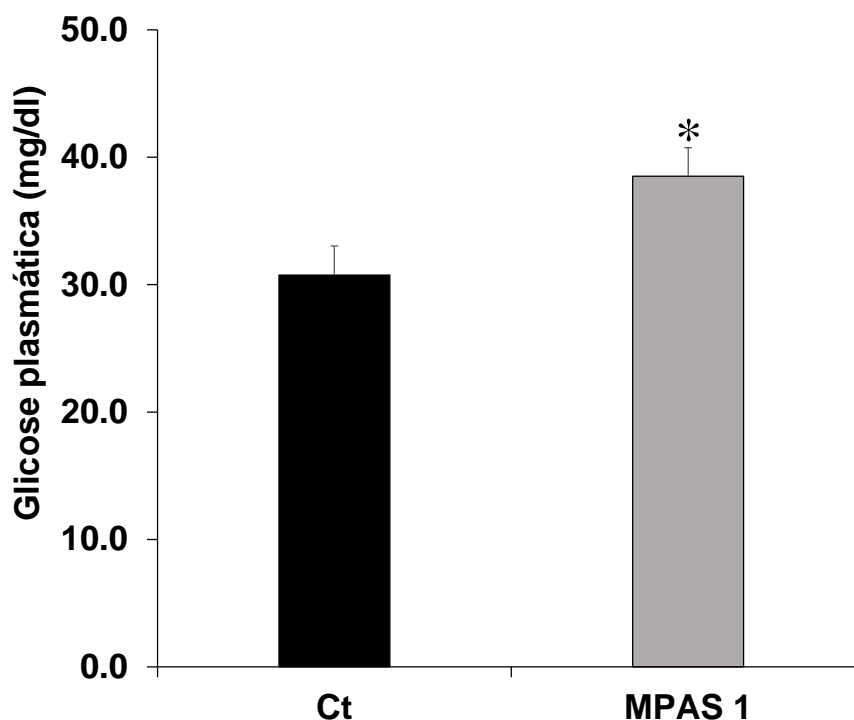
**Figura 46** - Valores médios de cortisol plasmático dos grupos controle e MPAS 1



Valores médios do cortisol plasmático dos grupos controle e expostos a concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Os níveis de glicose também foram superiores no grupo exposto. O grupo MPAS 1 apresentou valores médios de glicose 25% superiores ao controle. O valor médio de glicose do grupo controle foi  $30,75 \text{ mg/dl}$  e do grupo exposto MPAS 1 foi  $38,52 \text{ mg/dl}$ . A figura 47 apresenta os valores médios de glicose dos grupos controle e exposto ao MPAS na concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Figura 47** - Valores médios da glicose plasmática dos grupos controle e MPAS 1



Valores médios da glicose plasmática dos grupos controle e expostos a concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

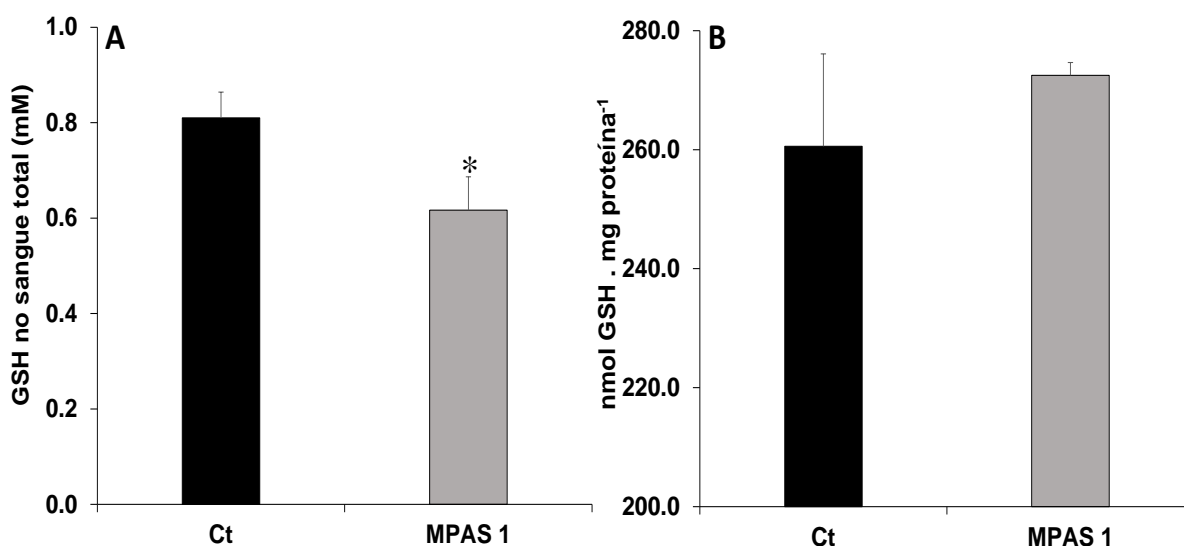
#### 4.4.5 Determinação do conteúdo de GSH no sangue total e coração

O grupo exposto ao MPAS 1 apresentou uma redução significativa do conteúdo de GSH no sangue total de aproximadamente 24% em relação ao controle. O valor médio de GSH do grupo controle foi de  $0,81 \text{ mM}$  e do grupo exposto MPAS 1 de  $0,61 \text{ mM}$ . A figura 48 (A) apresenta os valores médios de GSH no sangue total para os grupos controle e MPAS 1.

No tecido cardíaco não houve diferença significativa no conteúdo de GSH entre os grupos controle e MPAS 1. A figura 48 (B) apresenta os valores médios de GSH no coração para os grupos controle e MPAS 1.



**Figura 48** - Valores médios de GSH no plasma e coração dos grupos controle e MPAS 1



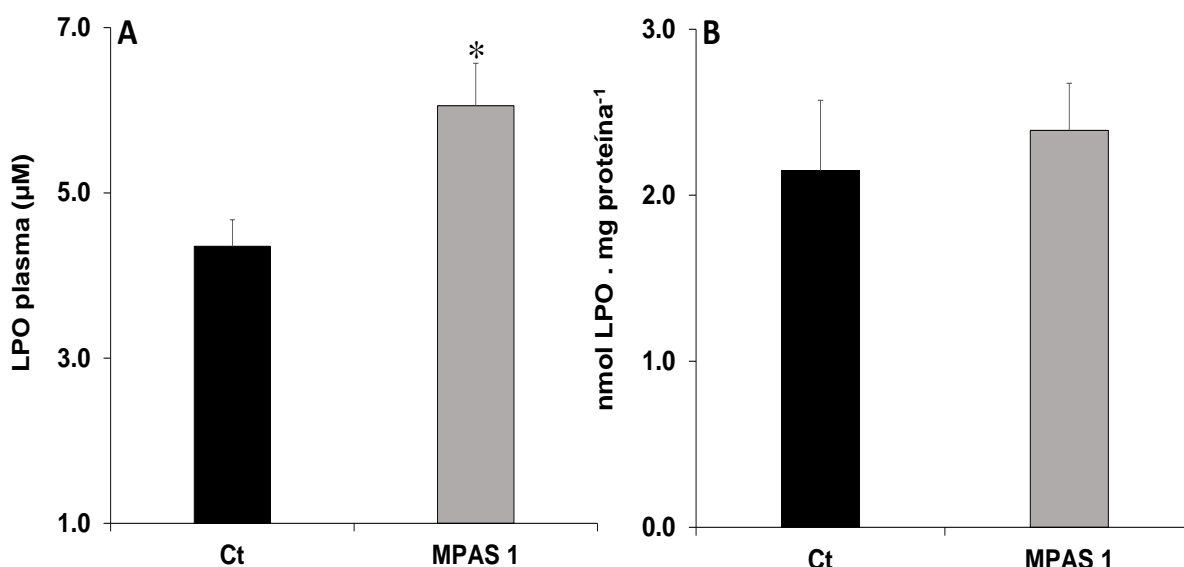
Valores médios da GSH no plasma (A) e coração (B) dos grupos controle e expostos a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4.6 Peroxidação lipídica (LPO) no plasma e coração

Os valores médios de peroxidação lipídica (LPO) no plasma do grupo exposto MPAS 1 foram significativamente superiores ao grupo controle, sendo 39% maiores. O valor médio de LPO do grupo controle foi de 4,35  $\mu$ M e do grupo exposto MPAS 1 foi 6,06  $\mu$ M. A figura 49 (A) apresenta os valores médios de LPO dos grupos controle e MPAS 1.

Os valores médios de peroxidação lipídica (LPO) no coração do grupo exposto MPAS 1 e do grupo controle não apresentaram diferenças significativas. A figura 49 (B) apresenta os valores médios de LPO no coração dos grupos controle e MPAS 1.

**Figura 49** - Valores médios da peroxidação lipídica no plasma e coração dos grupos controle e MPAS 1



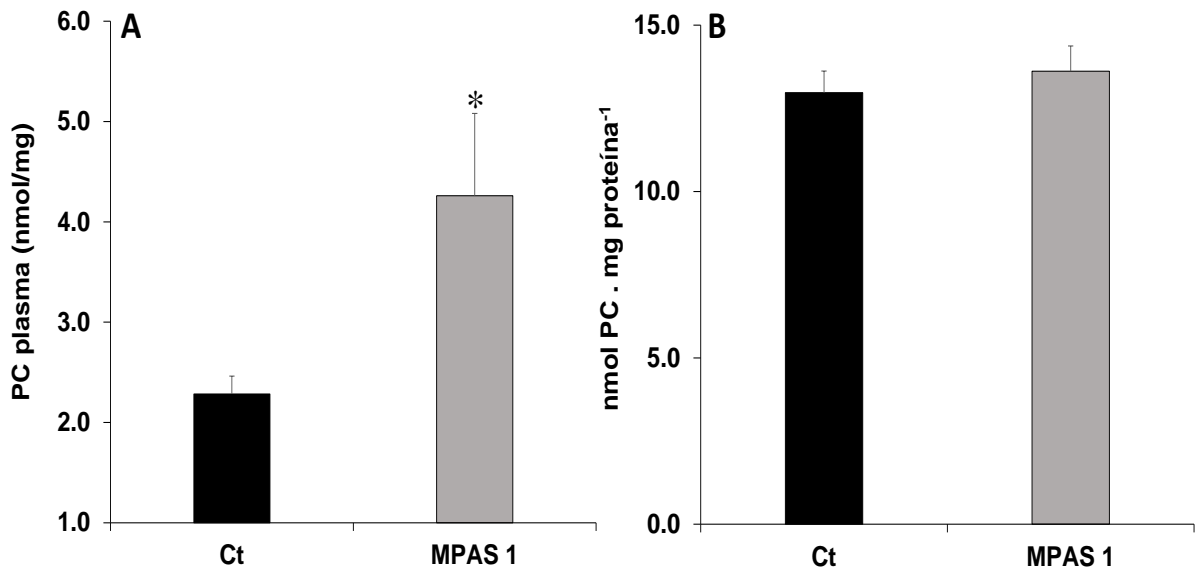
Valores médios da peroxidação lipídica (LPO) no plasma **(A)** e coração **(B)** dos grupos controle e expostos a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### **4.4.7 Determinação dos valores médios de proteína carbonilada (PC) no plasma e coração**

Os valores médios de proteína carbonilada (PC) no plasma de animais expostos ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> foram significativamente superiores ao grupo controle, sendo 87% maiores. O valor médio de PC do grupo controle foi de 2,28 nmol/mg de proteína e do grupo exposto MPAS 1 foi de 4,26 nmol/mg de proteína. A figura 50 (A) apresenta os valores médios de PC nos grupos controle e MPAS 1.

Não ocorreram diferenças significativas entre os valores médios de proteína carbonilada (PC) no tecido cardíaco de animais expostos ao MPAS na concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> em relação ao grupo controle. A figura 50 (B) apresenta os valores médios de PC no coração dos grupos controle e MPAS 1.

**Figura 50** - Valores médios da proteína carbonilada no plasma e coração dos grupos controle e MPAS 1

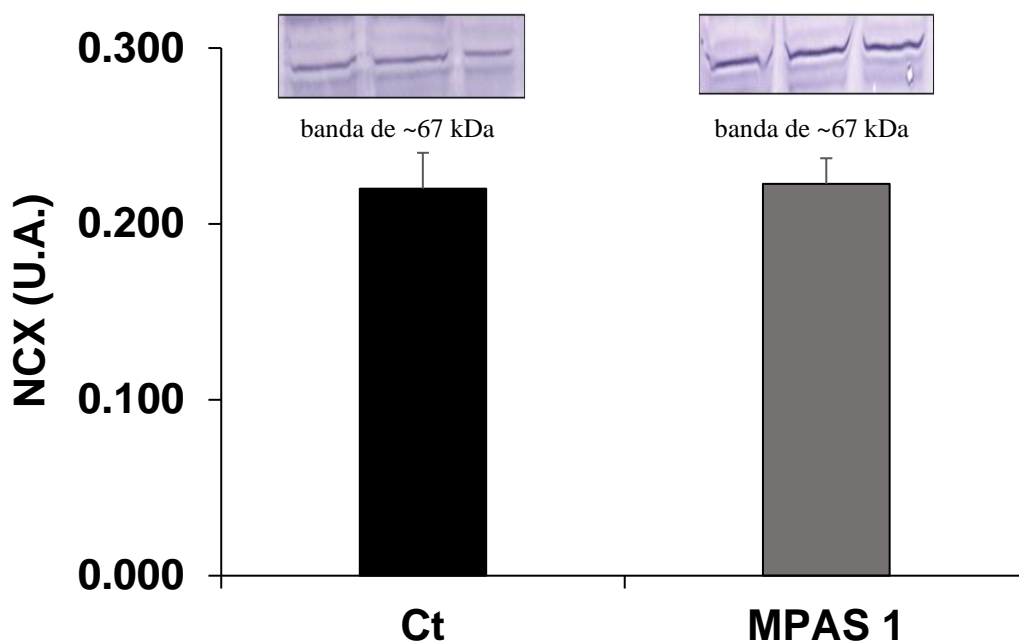


Valores médios da proteína carbonilada (PC) no plasma **(A)** e coração **(B)** dos grupos controle e expostos a concentração de 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS (MPAS 1). Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle. **Fonte:** elaborado pelo autor.

#### 4.4.8 Expressão do trocador NCX no ventrículo dos animais dos grupos controle e MPAS 1

Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos na expressão do trocador NCX1 do miocárdio das tilápias. A expressão de proteínas e os valores médios (U.A.) estão apresentados na figura 51.

**Figura 51** - Expressão da proteína NCX dos grupos controle e MPAS 1



Densidade óptica em unidades arbitrárias (U.A.) da expressão da proteína NCX no ventrículo de *O. niloticus*, dos grupos controle e exposto ao MPAS (MPAS 1). Os valores são média  $\pm$  EPM. **Fonte:** elabora pelo autor.

#### 4.4.9 Concentrações de metais em amostras de MPAS

A coleta do MPAS referente aos valores apresentados a seguir são de um lote de MPAS coletado durante a estação seca (Abril – Agosto) no ano de 2018. O referido lote foi utilizado tanto no desenvolvimento do presente estudo quanto em outro trabalho do grupo de pesquisa realizado por Fortes (2021), que avaliou a bioacumulação de metais em tilápias após a exposição ao MPAS. Assim, os dados de concentração de metais no MPAS foram reportados recentemente por este autor, em sua dissertação de Mestrado. Ambos os trabalhos compartilharam a mesma matriz de MPAS.

A análise de MPAS indica que sua composição contém 30 metais diferentes, sendo que apenas o Tântalo não foi quantificado por não atingir o valor mínimo necessário. A tabela 3 exibe os valores das concentrações de metais em amostras de MPAS. Os elementos que estão mais presentes nas amostras de MPAS são ferro (Fe-56), ferro (Fe-57), alumínio (Al), chumbo (Pb), titânio (Ti), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn).

**Tabela 3** - Concentração de metais ( $\mu\text{g/g}$ ) em amostras de MPAS. Lote de MPAS coletado na estação seca (Abril – Agosto) de 2018.

| Elemento | Concentração<br>$\mu\text{g/g}$ | LOD     | LOQ     |
|----------|---------------------------------|---------|---------|
| Ta       | 0,0000                          | 0,0178  | 0,0507  |
| Ag       | 0,1030                          | 0,0363  | 0,1019  |
| Hg 201   | 0,3229                          | 0,3720  | 0,9867  |
| Hg 202   | 0,3460                          | 0,0627  | 0,0994  |
| Bi       | 1,0791                          | 0,0268  | 0,0747  |
| Ba       | 1,3273                          | 0,0089  | 0,0105  |
| Cd       | 1,4739                          | 0,0866  | 0,2419  |
| W        | 1,6338                          | 0,0046  | 0,0131  |
| Se       | 2,2507                          | 0,5221  | 0,7967  |
| Nb       | 2,5564                          | 0,0012  | 0,0035  |
| As       | 2,9307                          | 0,2341  | 0,7796  |
| Rb       | 4,9249                          | 0,0378  | 0,0713  |
| Ni       | 14,7430                         | 0,0039  | 0,0115  |
| Sn       | 15,2154                         | 0,0089  | 0,0105  |
| Y        | 17,4013                         | 0,0009  | 0,0027  |
| B        | 20,0295                         | 0,5152  | 1,4307  |
| V        | 28,2162                         | 0,0377  | 0,1257  |
| La       | 29,9002                         | 0,0203  | 0,0677  |
| Cr       | 34,5293                         | 0,0598  | 0,1990  |
| Zr       | 43,7872                         | 0,1209  | 0,3018  |
| Pb       | 50,8589                         | 0,0478  | 0,1378  |
| Sr       | 56,6318                         | 0,0158  | 0,0436  |
| Ce       | 65,4940                         | 0,0204  | 0,0597  |
| Cu       | 84,7920                         | 0,0586  | 0,1951  |
| Zn       | 274,8618                        | 0,1118  | 0,3221  |
| Mn       | 554,9903                        | 0,5111  | 1,7020  |
| Ti       | 1.108,9440                      | 0,0567  | 0,1888  |
| Al       | 5.522,8039                      | 10,5030 | 12,8269 |
| Fe-57    | 67.327,7702                     | 6,5563  | 13,3324 |
| Fe-56    | 69.199,0411                     | 0,1790  | 0,5228  |

Dosagem de metais no MPAS. Os metais estão apresentados em ordem crescente de concentração. **LOD**: limite de detecção. **LOQ**: limite de quantificação. **Fonte**: Adaptado de FORTES (2021).

#### 4.4.10 Concentração de metais na água dos grupos controle e expostos ao MPAS na concentração de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$

As análises de concentração de metais dissolvidos na água dos grupos controle e MPAS 1 foram realizadas em amostras coletadas nos dias 0, 1, 2, 3 e 4. A tabela 4 contém a média da concentração de metais na água dos grupos controle e MPAS 1.

Os metais Cu, Fe-56, Al, Zn, Mn e Pb foram escolhidos para compor a tabela 4 devido a sua alta concentração e por terem limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/05 de 2005, enquanto o V e Ti foram escolhidos por apresentarem concentração elevada e por serem contaminantes emergentes.

**Tabela 4** - Concentração de metais ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) em amostras de água dos grupos controle e exposto ao MPAS ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ). Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M.

| Grupo         | Cu             | Fe-56          | Al             | Zn             | Mn             | Pb             | V              | Ti             |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Ct</b>     | 8,558          | 12,033         | 25,310         | 42,190         | <LOD           | 1,511          | 1,302          | 0,760          |
|               | $\pm$<br>0,689 | $\pm$<br>1,314 | $\pm$<br>0,440 | $\pm$<br>6,113 |                | $\pm$<br>0,123 | $\pm$<br>0,020 | $\pm$<br>0,056 |
| <b>MPAS 1</b> | 12,655         | 382,044        | 257,615        | 30,380         | 26,751         | 2,037          | 3,025          | 34,011         |
|               | $\pm$<br>0,390 | $\pm$<br>6,253 | $\pm$<br>5,220 | $\pm$<br>1,812 | $\pm$<br>0,275 | $\pm$<br>0,078 | $\pm$<br>0,044 | $\pm$<br>1,181 |

As concentrações destacadas em cinza indicam valores médios acima do estabelecido<sup>2</sup> pela Resolução CONAMA Nº 357/2005. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As concentrações de metais dissolvidos na água dos grupos controle e exposto ao MPAS na concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  foram comparadas com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA na categoria de águas dulcícolas de classe 2 (CONAMA nº 357/05, 2005).

O cobre (Cu) apresentou uma concentração média superior aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA no grupo exposto MPAS 1. O aumento da concentração de cobre no grupo exposto em relação a CONAMA foi de 41%, enquanto o aumento comparado ao grupo controle foi de 48%.

A concentração do ferro (Fe) também foi superior aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA no grupo MPAS 1. O aumento da concentração de ferro em relação a CONAMA foi de 27%, enquanto o aumento em relação ao grupo controle foi de 703%.

O alumínio (Al) exibiu uma concentração superior aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA no grupo MPAS 1. O aumento da concentração de alumínio em relação a CONAMA foi de 158%, enquanto o aumento em relação ao grupo controle foi de 918%.

<sup>2</sup>Resolução CONAMA Nº 357/2005. Concentração máxima permitida de metais: Alumínio  $100 \mu\text{g/L}$ ; Chumbo  $10 \mu\text{g/L}$ ; Cobre  $9 \mu\text{g/L}$ ; Ferro  $300 \mu\text{g/L}$ ; Manganês  $100 \mu\text{g/L}$ ; Zinco  $180 \mu\text{g/L}$ .

Os demais metais apresentados na tabela 4 (Zn, Mn e Pb) não apresentaram concentrações acima do limite estabelecido pela CONAMA nº 357/05 de 2005, no entanto, vale ressaltar que os corpos hídricos recebem constantemente a deposição de MPA, elevando a concentração de metais no ambiente natural.

Em relação aos metais vanádio (V) e titânio (Ti), importantes metais que constituem uma série de contaminantes emergentes, o aumento da concentração destes metais no grupo exposto comparado ao controle foi de 132% e 4375%, respectivamente.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs-se a avaliar os efeitos de uma exposição aguda, por 96 horas, ao MPAS em três diferentes concentrações realísticas ( $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contracção do miocárdio isolado de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

As menores concentrações de MPAS resultaram em algum efeito cronotrópico positivo com reduções nos valores absolutos de TPT e THR em determinadas frequências de estimulação. Tais alterações não foram acompanhadas de um aumento na Fc, embora a concentração intermediária de MPAS ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) tenha induzido uma relação força-frequência bifásica, em que a tensão isométrica aumentou na faixa fisiológica da frequência cardíaca da espécie, em relação aos valores iniciais. Por outro lado, o grupo exposto a maior concentração de MPAS ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) apresentou um efeito inotrópico positivo em todas as frequências de estimulação, levando a contracções mais fortes e rápidas (redução de TPT e aumentos das taxas de contracção), além de promover também um efeito lusitrópico positivo ao acelerar o relaxamento do miocárdio (redução do THR e aumento das taxas de relaxamento). Assim, parece haver uma resposta contrátil dose-dependente da concentração do *pool* de metais biodisponíveis no meio aquoso a partir de diferentes concentrações do MPAS.

As alterações nos parâmetros físico-químicos da água eram esperadas, no entanto, apenas a condutividade e a amônia foram alteradas em águas expostas ao MPAS. No grupo de maior concentração ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), a condutividade foi 28% superior ao controle, semelhante ao estudo realizado por Bilgin e Konanç (2016), em que encontraram correlação positiva entre os valores de condutividade e concentração de metais encontradas no Rio Coruh, localizado na Turquia. Dessa forma, o MPAS

provavelmente aumentou a quantidade de sais e outras substâncias dissolvidas na água, sendo um fator crucial para o aumento da condutividade elétrica, principalmente por conter ótimos condutores de eletricidade em sua composição, como o alumínio, cobre e zinco.

Em relação aos níveis mais elevados de amônia na água do grupo exposto a maior concentração de MPAS ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) é importante dizer que a concentração observada ficou no limite imposto pela legislação na Resolução CONAMA Nº 357 de 2005. De acordo com a resolução, o máximo permitido para águas doces de  $\text{pH} \leq 7,5$  é de  $3,7 \text{ mg/L}$  de nitrogênio amoniacal total. De acordo com a CETESB (2021), muitas espécies de peixes não suportam concentrações de amônia acima de  $5,0 \text{ mg/L}$ . Algumas hipóteses podem ser feitas em relação ao aumento da concentração de amônia na água, como por exemplo: 1) os efeitos tóxicos do MPAS podem ter aumentado a excreção nitrogenada dos animais, e 2) a presença de diversos metais podem favorecer a decomposição da matéria orgânica presente nos aquários, elevando os níveis detectáveis de amônia na água.

As mortes que ocorreram no grupo controle, MPAS 001 e MPAS 01 (1 morte em cada grupo), possivelmente estão associadas ao comportamento territorialista apresentado pela espécie. Nas observações diárias realizadas nos aquários, a briga/disputa de alguns animais era evidente, o que deve estar associado ao espaço reduzido dos aquários experimentais em comparação com os tanques de armazenamento e aclimatação. Diversos autores descrevem a tilápia-do-Nilo como uma espécie invasora e que exerce papel de dominância sobre outras espécies (GOUDSWAARD et al., 2002) e que pode afastar espécies nativas. Champneys et al (2020) provaram que a presença de *O. niloticus* é capaz de ser prejudicial para outras espécies de tilápia, como a *O. amphimelas*, devido a interação agonística das duas espécies. Contudo, Pinho-Neto et al (2014), demonstraram que *O. niloticus* é capaz de ser agressiva e competitiva com a própria espécie, apresentando uma relação de competição intraespecífica por recursos, incluindo território. Geralmente machos adultos competem e defendem seus territórios, enquanto fêmeas competem por recursos reprodutivos, além de apresentarem comportamentos agressivos variáveis (CARVALHO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2008). Tais informações sobre a espécie, aliadas às condições laboratoriais e experimentais podem, portanto, explicar a morte dos animais mesmo no grupo controle.



A partir das observações realizadas nos aquários de maior exposição ao MPAS ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), cenário em que não ocorreu a mortalidade de nenhum animal, o MPAS pode ter prejudicado os órgãos sensoriais dos animais e dificultado as disputas por território. De acordo com Solangi e Overstreet (1982), os danos causados por xenobióticos nos órgãos sensoriais de peixes são capazes de afetar o comportamento do animal, o que pode estar associado ao comportamento lento e estático dos animais na coluna d'água.

Os maiores valores de Fc, CBC e taxas de contração e relaxamento concomitantemente com os menores valores absolutos dos parâmetros tempo-dependentes (TPT e THR) exibidos pelas tiras ventriculares das tilápias expostas a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS (em todas as frequências de estimulação), indicam um aumento na concentração de cálcio transiente e de mecanismos mais eficientes de ciclagem deste íon. Coyne et al (2000) relatou que a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante determinante da força de contração miocárdica. Os mecanismos de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  são regulados principalmente pelo controle celular, canais de cálcio tipo L, bombas e trocadores como o de sódio-cálcio (KIRBY et al., 1992; CARAFOLI, 1987). As fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  são importantes para o mecanismo contrátil e para o acoplamento excitação-contração, sendo que as espécies possuem diferenças no manejo do  $\text{Ca}^{2+}$  e nas fontes do cálcio ativador entre elas. Driedzic e Gesser (1988) descrevem que a força de contração em vertebrados basais, como os peixes, pode aumentar de 50% a 500% quando se aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Em ratos, a exposição aguda ao chumbo ( $8 \mu\text{M}$ ) aumentou a Fc do miocárdio e diminuiu os valores de TPT (FIORESI et al., 2013), de modo similar aos resultados encontrados no presente estudo, em que  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS também induziu o aumento da Fc e redução do TPT. Os autores também identificaram um aumento da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, como sendo um possível causador dos efeitos inotrópicos positivos encontrados no estudo (FIORESI et al., 2013). O chumbo foi um dos metais encontrados em maior concentração em amostras de água contendo  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS, e dessa forma a hipótese de que ele seja o causador do efeito inotrópico positivo no miocárdio de tilápias não pode ser descartado. Ainda de acordo com os estudos de Fioresi et al (2013), o chumbo aumentou a atividade da miosina ATPase o que também pode assegurar a maior força desenvolvida frente à exposição.

Fioresi et al (2013) aponta ainda que a estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos colaboraram para a manutenção da maior contratilidade cardíaca em

ratos expostos ao chumbo, devido a liberação de catecolaminas induzidas pelo estresse. Da mesma maneira, a exposição ao MPAS (que contém concentrações elevadas de chumbo e outros metais) também pode causar a liberação de catecolaminas nas tilápias.

O efeito inotrópico positivo do grupo exposto a mais alta concentração de MPAS ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), sobre as tiras ventriculares de *O. niloticus*, pode estar diretamente relacionado com o estresse causado pela exposição à mistura de metais. A liberação de catecolaminas devido ao estresse é um fator determinante do desenvolvimento da Fc e CBC. Imbrogno et al (2010), ao utilizar a catestatina como inibidor da liberação de catecolaminas em enguias, *Anguilla anguilla*, observou um efeito de bloqueio da influência adrenérgica causada pelo isoproterenol (que atua nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos) com consequente redução do efeito inotrópico, indicando que as catecolaminas exercem um papel-chave no desenvolvimento de força do músculo cardíaco de peixes. Essa propriedade anti-adrenérgica da catestatina também foi observada em corações de rãs *in vitro* (MAZZA et al., 2008) e de ratos (ANGELONE et al., 2008).

Filetti (2018) ao expor ratos a  $10 \mu\text{g/mL}$  de  $\text{CuCl}_2$ , analisou parâmetros de contratilidade cardíaca e a participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) nas alterações induzidas pelo cobre na contratilidade. Estas alterações foram descritas, de maneira geral, como prejuízos na performance cardíaca pela redução da Fc, do tempo para pico de tensão e para 90% do relaxamento e das derivadas mínima e máxima. Para avaliação das respostas  $\beta$ -adrenérgicas foi utilizado o isoproterenol com e sem a presença de tempol, DMSO e catalase, para também avaliar os efeitos das ERO. Com a utilização do isoproterenol, a Fc aumentou, indicando que a presença do agonista  $\beta_1$  e  $\beta_2$  é capaz de influenciar positivamente a contratilidade cardíaca mesmo sob os efeitos de uma concentração elevada de chumbo. Em relação as ERO, o tempol e a catalase foram capazes de frear a formação e a ação das ERO nos cardiomiócitos, permitindo que a Fc fosse aumentada em maior grau com a presença destes antioxidantes.

No protocolo força-frequência, o comportamento das variáveis Fc, TPT e THR foram, em linhas gerais, semelhantes aos encontrados no protocolo de efeito do tempo. Entretanto, o protocolo do tempo, permitiu concluir que as tiras ventriculares dos animais expostos não suportaram manter o acoplamento E-C em *steady-state* ( $0,2 \text{ Hz}$ ) ao longo do tempo de 30 minutos, sugerindo que a exposição ao MPAS pode

alterar a ciclagem de pontes cruzadas após ter se alcançado o estiramento máximo (Frank-Starling) ao alterar a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , por ação direta ou indireta dos metais. Por exemplo, os íons tóxicos  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  são conhecidos por mimetizar o  $\text{Ca}^{2+}$ , devido a raios iônicos semelhantes na troponina C (RICHARDT et al., 1986).

O incremento gradual na frequência de estimulação é importante para avaliar possíveis efeitos do MPAS em frequências sub-fisiológicas, fisiológicas (observadas *in vivo* para a espécie) e supra-fisiológicas. Para a tilápia-do-Nilo, a frequência cardíaca *in vivo* é de ~0,6 Hz, ou seja, 36 bpm (batimentos por minuto) (THOMAZ, 2008). Com a aplicação do protocolo, o grupo controle atingiu a frequência máxima de estimulação elétrica de 2,4 Hz (288 bpm), enquanto os grupos expostos atingiram 2,8 Hz (336 bpm), sendo que a partir dessas frequências os registros tornaram-se irregulares.

Na maioria dos vertebrados basais o desenvolvimento de força em tiras cardíacas isoladas sofre uma redução em resposta ao aumento na frequência de estimulação. Essa relação é conhecida como força-frequência negativa (SHIELS et al, 2002), característica da espécie *Oreochromis niloticus*, conforme relatado por estudos de Thomaz (2008) e Costa et al (2000). A relação força-frequência negativa apresentada pela maioria dos peixes pode estar associada a uma menor eficiência do acoplamento excitação-contração, devido à uma baixa capacidade de obtenção do  $\text{Ca}^{2+}$  a partir das reservas intracelulares ou devido a inabilidade dos mecanismos responsáveis pelo efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando a um relaxamento incompleto e prejudicando o desenvolvimento de força nas maiores frequências (SHIELS, FARREL; 1997). A incompleta restituição mecânica foi evidenciada no miocárdio isolado de tilápia-do-Nilo pelo aumento da tensão de repouso das tiras ventriculares com a elevação da frequência de estimulação e em todos os grupos experimentais, o que reflete um relaxamento incompleto. Aumentos na tensão de repouso evidenciam uma maior dificuldade em reduzir os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  como aqueles observadas no repouso. Condições de elevado influxo deste íon através da sarcolema, devido à alta frequência dos potenciais de ação, fazem com que o  $\text{Ca}^{2+}$  permaneça disponível ao aparato contrátil. Assim, o desenvolvimento de força depende da disponibilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e do tempo da interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com o sistema contrátil (GESSER et al., 1997).

O aumento na frequência de estimulação reduz o tempo disponível para a remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  do interior da célula via retículo sarcoplasmático e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) (AHO; VORNAHEN, 1999; HOVE-MADSEN et al, 1998). A força-frequência negativa está relacionada com a menor obtenção de  $\text{Ca}^{2+}$  livre das reservas intracelulares, para o manejo do inotropismo em taxas de estimulação elevadas, afetando diretamente a eficiência do acoplamento E-C do músculo cardíaco (DRIEDZIC; GESSER, 1985). Em um experimento com o peixe teleósteo pacu, *Piaractus mesopotamicus*, foi avaliada a importância da disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  e da temperatura em tiras ventriculares. Foi identificado que com o aumento da temperatura ( $27,5^\circ\text{C} \sim 32,5^\circ\text{C}$ ) e da disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $2,5 \text{ mM} \sim 12,5 \text{ mM}$ ) o desenvolvimento de Fc aumentou e os valores de TPT e THR diminuíram progressivamente e significativamente. A força aumentou progressivamente conforme os incrementos nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  em ambas as temperaturas. Esses resultados indicam que o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é de suma importância para a contração nessa espécie (ANELLI et al., 2004). O miocárdio de tilápia, de maneira semelhante ao pacu, é dependente quase que exclusivamente do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (COSTA et al., 2000). Os efeitos da complexa mistura de metais e metalóides presentes no MPAS podem estar associados a interferências no fluxo de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  ou até mesmo a possíveis respostas adrenérgicas, como visto anteriormente.

Ainda não se pode descartar a possibilidade de efeitos diretos desses metais em outros sistemas de controle homeostático do organismo. Por exemplo, exposições agudas ( $20 \mu\text{M}$  por 2 dias) e sub-crônicas ( $10 \mu\text{M}$  por 20 dias) ao cádmio e chumbo aumentaram significativamente a atividade da ATPase nos eritrócitos de *O. niloticus* (ATLI et al., 2016). O aumento significativo da atividade da ATPase pode causar uma disfunção metabólica dos eritrócitos. Somado à possíveis disfunções eritrocitárias, os metais como o chumbo são captados pelas brânquias e podem alterar a sua morfologia, promovendo desequilíbrios osmóticos e iônicos (AL-BALAWI, et al., 2013; MARTINEZ et al., 2004). Tais efeitos podem levar ao comprometimento da função respiratória (EVANS, 1987) causando uma hipoxemia (baixa concentração de oxigênio no sangue arterial), mesmo em normóxia, quando o oxigênio dissolvido na água encontra-se em concentração elevada ( $\text{PO}_2$  acima de  $100 \text{ mm.Hg}$ ). Tilápias vermelhas híbridas (*Oreochromis sp*) expostas por 96 horas a  $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de chumbo na água, exibiram lesões do epitélio branquial como fusão em lamelas secundárias adjacentes, hipertrofia e hiperplasia de células de cloreto e necrose (MOHAMMED et

al., 2016). Exemplares de robalo-perva, *Centropomus parallelus*, coletados nos estuários da Baía de Vitória e Santa Cruz (Estado do Espírito Santo, Brasil), região altamente impactada pelo MPAS, mostraram uma resposta tecido-específica de bioacumulação com altos níveis de metais e metalóides nas brânquias (SOUZA et al., 2018).

Dessa forma, a exposição ao MPAS pode ter aumentado a demanda de oxigênio e/ou nutrientes dos tecidos, levando a um maior bombeamento cardíaco na tentativa de garantir um adequado aporte de substâncias essenciais. As alterações na demanda de oxigênio e na taxa metabólica são acompanhadas por ajustes ventilatórios, cardiovasculares e bioquímicos para atender as necessidades de oxigênio e nutrientes do tecido (RANDALL; CAMERON, 1973). Em um estudo dirigido por De Angelis (2020), tilápias-do-Nilo submetidas a exposição aguda (96 horas) ao MPAS ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) em situação de normóxia, mostraram reduções significativas de performance fisiológica. Foi constatado, por exemplo, que os animais expostos apresentaram reduções na taxa metabólica padrão, na velocidade natatória crítica e na natação máxima. Essas alterações ocasionadas em resposta ao MPAS e somadas às respostas cardíacas observadas no presente estudo afetam o suporte fisiológico para questões ecológicas como a sobrevivência, alocação de energia, capacidade de natação, potencial de migração, forrageio e reprodução.

Tais hipóteses, aliadas aos menores valores de hemoglobina dos animais expostos ao MPAS, apontam para um provável quadro de hipoxemia. O estresse causado pela exposição aos metais pode reduzir o oxigênio entregue para os tecidos, levando a uma situação de hipoxemia e de deficiência energética (SOKOLOVA; LANNIG, 2008). Wright et al (1989) dizem que a hipóxia aguda é capaz de aumentar os níveis de catecolaminas, ativando a gliconeogênese e glicogenólise devido ao aumento dos níveis de glicose plasmática em decorrência do estresse. Nesse sentido, as tilápias expostas ao MPAS apresentam altos níveis de glicose e cortisol plasmáticos após a exposição ao MPAS. A elevação dos níveis de glicose plasmática e cortisol indicam a condição de estresse e a necessidade de energia para suportar a situação desfavorável (TORT, 2011). Estas informações colaboram com a hipótese de que o MPAS desencadeia uma cascata de eventos e respostas ao estresse que culminam com a liberação de catecolaminas que, por sua vez, foram capazes de induzir um efeito inotrópico positivo registrado nas tiras ventriculares.

Diversos estudos analisam a CBC de teleósteos frente aos efeitos tóxicos de diferentes agentes contaminantes (FERRO, 2014; THOMAZ, 2008; COSTA et al., 2000). Na maioria dos casos, essa capacidade é reduzida devido à redução da Fc. Em um estudo desenvolvido por Monteiro et al. (2017), a capacidade de bombeamento cardíaco de matrinxã e traíra, *Brycon amazonicus* e *Hoplias malabaricus*, foi prejudicada devido aos efeitos tóxicos de mercúrio inorgânico. A sobrevivência de vertebrados depende da integridade de sua função cardíaca, incluindo os ajustes necessários de débito cardíaco sob condições ambientais adversas (DRIEDZIC; GESSER, 1994). Ainda de acordo com Monteiro et al. (2017), a eficiência do coração depende da contratilidade miocárdica, que, por sua vez, depende do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Nesse caso, os animais não foram capazes de manter a frequência cardíaca normal devido à disfunção do miocárdio em resposta ao mercúrio.

No presente estudo, a CBC foi maior em animais expostos ao MPAS em todas as frequências de estimulação, o que pode ser associado a uma estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos devido à liberação de catecolaminas em resposta ao estresse de exposição. A regulação  $\beta$ -adrenérgica no coração de peixes é um mecanismo central na manutenção da função cardíaca normal e da adaptação do músculo cardíaco a mudanças fisiológicas e a condições ambientais. Desta forma, a adrenalina e a noradrenalina estão envolvidas em situações em que são necessários aumento da performance cardíaca (VORNANEN, 1998 e OLSON et al., 2000). O efeito protetor se deve a seus efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos (OLSON et al., 2000). Em peixes, as catecolaminas são liberadas em resposta a uma série de agentes estressores agudos e crônicos (GAMPERL et al., 1994), variando desde exercícios exaustivos (ROTHWELL et al., 2005) à exposição a agentes tóxicos e poluentes (WENDELAR-BONGA, 1997).

A exposição à mais alta concentração de MPAS, contendo elevados níveis de metais, pode ter resultado na liberação de altos níveis de catecolaminas pelas células cromafins das tilápias, caracterizando uma típica resposta de estresse em peixe. Em cachorro, a injeção intravenosa de cloreto de manganês (25 a 100 mg/kg), um dos metais dissolvidos presentes em elevada concentração na água contendo  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS, aumentou a força de contração do miocárdio (CONRAD et al., 1966). Tal efeito foi completamente abolido pelo bloqueio farmacológico dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. O aumento da atividade dos sistemas de transporte de cálcio após a

estimulação adrenérgica resulta em uma taxa de relaxamento mais rápida (lusitropismo positivo), enquanto um possível efeito inotrópico positivo pode vir a ocorrer como consequência de uma maior disponibilidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil, conforme os resultados observados no presente estudo no tecido cardíaco de tilápia-do-Nilo após a exposição a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS.

Corroborando os resultados do presente estudo, Fioresi (2008) ao avaliar os efeitos de concentrações elevadas de chumbo em ratos ( $160 \text{ µg/dl}$ , 100 acima do limite brasileiro), observou um aumento da Fc em todos os períodos de exposição. A causa do inotropismo positivo foi associada ao registro de aumento da pressão sanguínea e a hiperatividade dos receptores  $\beta$ , aumentando a disponibilidade de cálcio para os cardiomiócitos. Outra possível explicação para o inotropismo positivo são os efeitos danosos do chumbo no sistema nervoso autônomo, que pode disparar adrenalina e noradrenalina pelo sangue e ser um dos motivos para o aumento da performance cardíaca. Segundo os autores, a exposição aguda ao chumbo em ratos pode causar hiperatividade dos receptores  $\beta_1$ , aumento das respostas cardiovasculares aos agonistas  $\beta_1$  e  $\beta_2$  nas células miocárdicas, aumento das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) circundantes e aumento da disponibilidade de cálcio via AMPc (ativação  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  adrenérgica). A ativação  $\beta$ -adrenérgica causa a fosforilação dos canais de cálcio do sarcolema no miócito, aumentando a entrada de cálcio pelos canais e causando o inotropismo positivo.

A adrenalina é a principal catecolamina que afeta a contratilidade cardíaca na maioria das espécies de teleósteos (ASK et al., 1983), podendo causar efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos. A adrenalina costuma agir nos receptores  $\beta_1$  do coração, estando relacionada principalmente nos efeitos inotrópicos, devido a alteração no influxo de cálcio (HIPKINS, 1985). Em trutas arco-íris, por exemplo, a adrenalina é capaz de alterar a taxa de contração, o débito cardíaco e o volume de sangue ejetado (KEEN et al., 1993). Gamper et al (1994) reportaram que repetidas injeções contendo catecolaminas em trutas arco-íris em águas em condição de hipóxia e normóxia são capazes de modificar a densidade de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos no coração, sugerindo que as catecolaminas circulantes são capazes de impedir o “*down-regulation*” dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos causados em situação de hipóxia. Laughlin et al (1992) sugerem que os efeitos da adrenalina no músculo cardíaco são explicados por aumentos na taxa de contração. Vale ressaltar que mudanças na Fc e na frequência cardíaca podem alterar as demandas metabólicas do coração. Porém,

pouco se sabe sobre como as catecolaminas podem impactar no uso de energia do coração de peixes (MOON; FOSTER, 1995).

A liberação de adrenalina pode ser um mecanismo de tentativa de regulação em situações de estresse. Ninkinmaa (1983) observou que os efeitos da adrenalina aumentaram a afinidade das hemoglobinas ao oxigênio em trutas arco-íris. Os achados foram ainda mais expressivos em situações de pH extracelular mais elevado. Dessa forma, as catecolaminas podem ser um importante meio de regulação do transporte de oxigênio em situações de esforço, emergência e estresse, como visto anteriormente.

No coração, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos atuam através da estimulação da proteína G, ativando a adenilato ciclase e a proteína quinase A (PKA) e, deste modo, promovendo a fosforilação do canal de cálcio tipo L. Esta fosforilação resultará em uma maior abertura dos canais (VORNANEN, 1998; KIM et al., 2000), aumentando a disponibilidade de cálcio ao aparato contrátil. Outra ação da estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos é produzir um efeito lusitrópico positivo alterando a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, por meio da fosforilação da troponina I (TnI) via AMPc, aumentando assim a taxa de desligamento entre este íon e a troponina C, sendo então observado um relaxamento mais rápido na presença de  $\beta$ -agonistas (BERS, 2001).

Além disso, a adrenalina é capaz de estimular a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase da sarcolema (BERS, 2001; HOVE-MADSEN & GESSER, 1989), impedindo a acumulação intracelular de  $\text{Na}^+$  e, assim, favorecendo o efluxo de cálcio através do trocador NCX. No presente estudo, apesar de não haver alteração significativa na expressão do trocador NCX no miocárdio das tilápias expostas ao MPAS, as ações adrenérgicas podem, assim, ter contribuído para os menores valores absolutos do THR, para as maiores taxa de relaxamento das tiras ventriculares e para o decaimento pós-pausa da tensão isométrica, considerando que o NCX é a principal proteína responsável pela extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos de tilápias.

É de conhecimento amplo que o retículo sarcoplasmático (RS) possui graus de desenvolvimento de acordo com as diferentes espécies de peixes (SANTER, 1985). Em geral, o RS em peixes é pouco desenvolvido anatomicamente e com menos importância no acoplamento E-C quando comparado aos mamíferos. O RS de bacalhau, *Gadus virens*, corresponde a 0,6% do volume do miócito, enquanto em mamíferos os valores variam de 3,5% a 7% do volume do miócito (HELLE, 1983;



LEKNES, 1984). As diferenças entre o RS de mamíferos e de peixes podem resultar em efeitos positivos (RS desenvolvido) ou negativos (RS pouco desenvolvido) após tiras ventriculares serem submetidas a pausas na estimulação.

No caso da tilápia-do-Nilo, houve um decaimento da Fc após a pausa de 300 segundos para o grupo controle e após pausas de 30, 60 e 300 segundos para os grupos expostos. Tais resultados indicam que o RS é pouco desenvolvido e não funcional nessa espécie, visto que não desempenha um papel importante como fornecedor de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aparato contrátil na maioria das espécies de teleósteos (VORNANEN et al., 2002). Na pausa diastólica de 300 segundos, ainda houve um decaimento mais acentuado na Fc em relação ao controle, indicando uma maior atividade do NCX nos animais expostos, permitindo um maior efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o período de repouso e, conseqüentemente, uma menor concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  transiente na primeira contração subsequente a pausa. Corroborando esses resultados, Ferro (2014), demonstrou que a exposição do cascudo, *Hypostomus regani*, ao pesticida Fipronil ( $4,23 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) promoveu um decaimento da Fc após pausas diastólicas não fisiológicas, além de promover um efeito inotrópico positivo no desenvolvimento de força em diferentes frequências de estimulação. O autor demonstrou também que a inibição do NCX pelo lítio provocou uma redução da Fc, indicando que o trocador desempenha um papel importante na ciclagem cálcio, uma vez que a espécie não mostrou possuir um RS funcional.

Em ratos expostos a concentrações agudas de cobre ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) por 60 minutos, a Fc foi menor após pausas diastólicas de 15, 30 e 60 segundos no grupo exposto ao metal (FILETTI et al., 2018). Os autores sugerem que o cobre é capaz de afetar a função do retículo sarcoplasmático em ratos, que possuem o RS funcional. Por outro lado, a aplicação de cálcio extracelular resultou em uma menor redução da Fc no grupo exposto, indicando um baixo nível de influxo de cálcio transsarcolemal. Protsenko et al (2020) ao avaliar os efeitos de cádmio e chumbo em ratos ( $\text{Pb} = 6,01 \text{ mg}$  e  $\text{Cd} = 0,37 \text{ mg}$  por kg de massa corpórea) verificou pequenas reduções na primeira contração após pausas diastólicas de 15 segundos. Os autores concluíram que ocorre um desequilíbrio entre a liberação e receptação do cálcio no RS quando estão expostos ao cádmio. O cádmio é um inibidor conhecido do trocador NCX e dos canais de cálcio do tipo L (UEHARA et al., 2002; WASSESTROM, 1999).

O aumento da concentração de metais na água após a exposição ao MPAS está de acordo com o apontado por Souza et al (2021), que mostrou o potencial de

desagregação do MPAS em ambientes aquáticos, tornando os metais e nanopartículas metálicas biodisponíveis na água. A acumulação de metais em peixes pode ocorrer pelas brânquias/pele, ingestão de material suspenso na água ou pela ingestão de alimentos contaminados. A concentração de metais nos organismos é determinada pela razão entre a captação e excreção desses elementos (OOST et al., 2003).

Em um estudo realizado por Fortes (2021) acerca da bioacumulação do MPAS em *O. niloticus*, foram realizadas exposições de 30 dias a concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ , constatou-se o acúmulo de metais (Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb) em vísceras e músculo branco no grupo exposto em praticamente todos os dias de coleta de amostras (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 e 30 dias). O fator de bioacumulação (BCF) foi acima de 1 para o Cu, Fe, Al e Zn no grupo exposto, sendo suficiente para caracterizar a bioacumulação destes metais nos tecidos, exceto Mn e Pb nos dias 0, 18, 24 e 30 (FORTES, 2021). Lobos et al. (2019) ao coletarem exemplares de *Salmo salar* na região de Los Lagos, sul do Chile, detectaram a presença de Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em músculo, fígado e brânquias sendo que dentre esses metais ocorreu a bioacumulação de Cu e Fe no fígado e de Mn e Zn nas brânquias. A partir da análise de componentes principais (PCA) os autores concluíram que os metais aparentam ter maior afinidade com tecidos específicos, tanto em alevinos quanto em indivíduos no estágio pré-juvenil.

De acordo com Exley et al (1991) a principal entrada de Al em peixes ocorre pelas brânquias, e os efeitos de sua toxicidade levaria a disfunções iônicas e osmorregulatórias neste órgão. O zinco é um metal essencial e ocorre naturalmente no organismo, sendo as brânquias sua principal rota de entrada (WOOD et al., 2011). O chumbo possui alta toxicidade para peixes e é capaz de causar estresse oxidativo, neurotoxicidade e imunocomprometimento (LEE et al., 2019). Dessa forma, é importante avaliar os danos causados por esses e outros metais em parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais expostos ao MPAS.

Dane e Sisman (2019) verificaram que no rio Karasu em 2015, Turquia, foram detectadas concentrações de metais acima dos limites estabelecidos pela legislação local, dentre eles: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Sr e Pb. A situação foi agravada ainda mais devido ao aumento nas concentrações desses metais listados no ano seguinte, em 2016. Dessa maneira, foram coletados ciprinídeos da espécie *Alburnus mossulensis* para verificação da saúde do fígado. Por meio de análises

histológicas foram constatados danos no fígado como congestão, dilatação sinusoidal, degeneração celular, infiltração do parênquima, hipertrofia e vacuolização. No mesmo estudo, foi observado um aumento dos valores do índice hepatossomático (IHS) entre os anos de 2015 e 2016, possivelmente pelo aumento das concentrações dos metais listados acima no ano de 2016. Os autores ressaltaram que tais resultados indicam que o IHS é um bom indicador de poluição ambiental e do estado de saúde de animais expostos à altas concentrações de metais, principalmente por refletir danos que possam ter ocorrido em um intervalo pequeno de tempo (DANE; SISMAN, 2019).

No presente estudo, a exposição ao MPAS também causou um aumento significativo do índice hepatossomático (IHS) das tilápias. O MPAS possui uma composição de metais semelhante ao estudo descrito anteriormente. Figueiredo-Fernandes *et al* (2007) ao expor tilápias-do-Nilo a concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre, obteve diferenças nos valores de IHS e do número de núcleos de hepatócitos, células que compõe majoritariamente o parênquima do fígado. Foi observado que o IHS aumentou 32%, 36% e 51%, enquanto o número de núcleos de hepatócitos reduziu 65%, 80% e 90% conforme o aumento da concentração do metal. Os fígados das tilápias expostas ao sulfato de cobre apresentaram necrose e vacuolização. Assim, a hipótese de que as tilápias expostas ao pool de metais presentes no MPAS possam ter sofrido danos no fígado, principal órgão responsável pela desintoxicação em peixes, resultando em um aumento do valor de IHS, deve ser levada em consideração.

Geralmente peixes contaminados apresentam hipertrofia e hiperplasia hepáticas na tentativa de maximizar o processo de desintoxicação frente à contaminantes (PORTER; JANZ. 2003; VAN DER OOST *et al.*, 2003; FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2006). Em testes de toxicidade aguda LC<sub>50</sub> por 96 horas, matrinxãs (*Brycon amazonicus*) expostos a mercúrio inorgânico (HgCl<sub>2</sub>) apresentaram um aumento dos valores de IHS acompanhado por aumentos da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GST e GR) no fígado, brânquias, músculo branco e coração (MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2010). O mercúrio em concentrações ambientalmente relevantes é capaz de causar estresse oxidativo em diversos órgãos de matrinxã, além de causar impactos negativos no seu comportamento, saúde, performance e sucesso reprodutivo (MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2010).

A massa ventricular relativa (MVR) é um índice variável em peixes, tanto interespecífico como intraespecífico (FARREL; JONES, 1992). A MVR está

diretamente relacionada com o débito cardíaco (HILLMAN, 1976). O aumento da MVR pode estar relacionado a demandas maiores de performance cardíaca em função da exposição a contaminantes, ocasionando uma possível hipertrofia cardíaca (CALORE et al., 2007). No presente estudo, a MVR foi significativamente maior no grupo exposto ao MPAS, o que poderia estar associado a uma hipertensão arterial sistêmica devido a maior exigência de bombeamento sanguíneo para atender a demanda por substâncias essenciais. Os resultados de contratilidade cardíaca contribuem para a hipótese de hipertrofia do miocárdio.

No presente estudo, algumas variáveis hematológicas foram alteradas devido ao estresse induzido pelo MPAS. A hemoglobina e a proteína plasmática total, por exemplo, sofreram reduções significativas devido a exposição ao MPAS. De acordo com o estudo de Bittencourt et al (2003), tilápias-do-Nilo criadas em um sistema semi-intensivo apresentaram valores de hemoglobina em torno de 10,52 g/dl e proteína plasmática total de 3,06 g/dl. Neste presente estudo, os valores encontrados de hemoglobina foram de 11,14 g/dl para o grupo controle e de 8,68 g/dl para o grupo exposto a 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS, indicando uma redução significativa. De maneira semelhante, a proteína plasmática total do grupo controle foi de 1,05 g/dl e do exposto ao MPAS de 0,54 g/dl, indicando novamente uma redução significativa.

As avaliações hematológicas em peixes auxiliam a esclarecer os efeitos de produtos tóxicos na água e de possíveis alterações ambientais, ou seja, as alterações hematológicas tornaram-se ferramentas de avaliação da perturbação homeostática em peixes (DE PAIVA et al., 2013). Animais em situação de estresse geralmente apresentam baixa concentração de hemoglobina, indicando prejuízos no transporte de oxigênio para os tecidos (WITESKA, 2015). A baixa concentração de hemoglobinas pode ainda ser um dos fatores que causam anemia em animais que estão sobre estresse, acompanhada por reduções em outros parâmetros como os eritrócitos e hematócitos, podendo prejudicar as demandas energéticas e reduzir taxas de crescimento e de reprodução (WITESKA, 2015).

Diversos estudos indicam que a exposição de peixes a agentes estressores, como os metais, altera de alguma forma as variáveis hematológicas. Os autores Abdel-Tawwab e Wafaek, em 2017, submeteram tilápias-do-Nilo a mudanças de temperatura (20, 24, 28 e 32 °C) e a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cádmio, durante um período de 56 dias. Em todas as temperaturas avaliadas constatou-se redução (56%, 78%, 79% e 67% de acordo com o aumento de temperatura, respectivamente) da hemoglobina no

sangue em animais expostos ao cádmio. Os autores concluíram que as variações hematológicas foram respostas a exposição de metais, que, por sua vez, causaram alterações osmóticas como a hemodiluição e hemoconcentração (TORT; TORRES, 1988). Da mesma maneira, Shaw e Handy (2006) verificaram que tilápias-do-Nilo expostas via dieta ao cobre (ingestão de 2000 mg.Cu.Kg<sup>-1</sup>) por 42 dias apresentaram reduções nos valores de hemoglobina, acompanhados por danos no fígado e pela formação de manchas de sangue, aumento dos níveis de gordura e por formação de pontos de necrose. Os autores também encontraram valores de IHS superiores em animais expostos, provavelmente devido ao aumento de lipídios no fígado e pela maior necessidade de nutrientes para manter-se em condição de estresse. A exposição ao MPAS reduziu o nível de hemoglobinas no sangue de tilápias, prejudicando a capacidade de transporte de oxigênio. É importante ressaltar que os resultados encontrados *ex vivo* indicam uma Fc e CBC maiores no grupo MPAS 1 que são respostas cardíacas compensatórias frente a um aumento da demanda de oxigênio.

Monteiro et al (2005) ao expor tilápias-do-Nilo a concentrações de 40 e 400 µg.L<sup>-1</sup> de cobre, por um período de 3, 7, 14 e 21 dias, observou que os valores de proteína plasmática total reduziram significativamente após 21 dias de exposição (cerca de 40% em ambas concentrações), do mesmo modo que ocorreu no presente estudo. Além da redução na proteína plasmática total, foi observado um acúmulo significativo de cobre nas brânquias em ambas as concentrações testadas, indicando uma possível disfunção do epitélio branquial e aumento da permeabilidade vascular (MONTEIRO et al., 2005). A redução das proteínas totais (albumina e globulina) pode influenciar o balanço hormonal, estado geral do fígado e indicar estresse (HASEGAWA et al., 2002) além de interferir no sistema imune, enzimas e proteínas transportadoras (THRALL, 2007). Monteiro e colaboradores (2005) associaram as reduções de proteínas plasmáticas ao acúmulo do cobre nas brânquias como produto da disfunção epitelial e pelo possível aumento da permeabilidade vascular. As proteínas plasmáticas são essenciais para a nutrição e defesa do organismo contra infecções e parasitas (VUREN, 1980). Reduções nas proteínas plasmáticas podem alterar o pH do sangue ou ainda interferir na osmolaridade do plasma (SATCHELL, 1971).

Ainda de acordo com o estudo citado anteriormente, Monteiro e colaboradores verificaram também que os animais expostos ao cobre obtiveram aumentos

significativos nas concentrações de cortisol e glicose plasmática. A glicose foi superior em todos os períodos de exposição, sendo cerca de 50% maior no grupo exposto à maior concentração de cobre ( $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e, nos dias finais de exposição (14 e 21 dias) o aumento na glicose foi de 100% a 200% superior. Da mesma forma, o cortisol plasmático chegou a ser 285% superior ao grupo controle. Os autores concluíram que os tilápias foram capazes de ativar mecanismos compensatórios quando expostos à agentes estressores. O aumento do cortisol, por exemplo, pode estar associado a uma redução na perda de íons e uma tentativa de frear o aumento da permeabilidade epitelial (KELLY; WOOD, 2002). O aumento dos níveis de cortisol evita a necrose celular (BURY et al., 1998) e estimula a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , aumentando o transporte de íons (FLIK; PERRY, 1989; SHRIMPTON; MCCORNICK, 1999) e a capacidade de transporte de íons nas brânquias (GOSS et al., 1992), devido à fragilidade desse órgão por ser um dos primeiros a sofrer com o acúmulo de metais no organismo, juntamente com o fígado. Os animais expostos ao cobre apresentaram adaptação rápida e descompensação de outros parâmetros ao longo do tempo, indicando que o cortisol e a glicose plasmática são indicadores de estresse (MONTEIRO et al., 2005).

O cortisol plasmático e a glicose estão entre os indicadores mais comumente usados para identificar o estresse em peixes. A resposta primária a um estressor agudo normalmente inclui a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal e do sistema adrenérgico, resultando, respectivamente, em aumentos nos níveis circulantes de cortisol e dos hormônios catecolaminas, adrenalina e noradrenalina (WANDELAR-BONGA, 1997).

Situações de estresse envolvem desequilíbrio dos organismos, ou da homeostase, resultante da ação de estímulos denominados estressores (WANDELAR-BONGA, 1997). As respostas ao estresse podem ser classificadas em: primária (alteração hormonal), secundária (alteração fisiológica e bioquímica) e terciária (alteração no crescimento de indivíduos, aumento da ocorrência de doenças etc.) (MAZEAUD et al., 1977; WEDEMEYER; MELEAY, 1981). O cortisol plasmático é classificado como primário, por ser uma alteração dos níveis hormonais. A glicose plasmática é secundária e está diretamente relacionada com o cortisol, pelo fato de altas concentrações de cortisol causarem glicogéogenese e glicogénólise no fígado, resultando em hiperglicemia na tentativa de suprir o aumento da demanda por energia dos animais durante o estresse (IWANA, 1998; MOMMSEM et al., 1999). O aumento

dos níveis de cortisol e glicose tem origem glicogenolítica proveniente da ação dos corticostiróides e catecolaminas (MOMMSEM et al., 1999).

A exposição aguda ao MPAS induziu uma resposta ao estresse nas tilápias, visto que a concentração de cortisol plasmático no grupo exposto ao MPAS foi 66% superior ao controle. A glicose, por sua vez, foi 25% superior no grupo exposto, confirmando que o MPAS é um agente estressor. Firat et al (2011) ao exporem tilápias-do-Nilo a cobre e chumbo (metal essencial e não essencial ao organismo), na concentração de 0,05 mg.L<sup>-1</sup> por períodos de 4 e 21 dias, observaram aumentos nas concentrações de cortisol e glicose plasmáticos para ambos os metais testados e tempos de exposição. As elevadas concentrações de glicose indicam um uso exacerbado das reservas de energia pelos animais na tentativa de sobreviver ao estresse. A resposta hiperglicêmica também pode estar relacionada a uma disfunção do metabolismo devido ao aumento da atividade da glicose 6-fosfatase levando a degradação do glicogênio hepático (FIRAT et al., 2011), principalmente por ser o principal órgão responsável pela desintoxicação em situações de contaminação.

Os altos níveis de cortisol indicam situação de estresse nos animais expostos ao MPAS. De acordo com Perry e Reid (1993), o cortisol possui a habilidade de modular os receptores  $\beta$ -adrenérgicos das superfícies celulares. Em condições normais de oxigênio e energia, o cortisol impacta diretamente na habilidade das células em responder à altos níveis de catecolaminas no plasma, podendo induzir ao inotropismo e cronotropismo positivo conforme descrito anteriormente. O cortisol é um estimulador da produção de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Em relação ao transporte de gases, o cortisol e as catecolaminas possuem efeitos interativos na tentativa de estabelecer a homeostase em situações de estresse (PERRY; REID, 1993).

Em um estudo com os peixes corvos-do-mar, *Hemitripterus americanus*, foram realizadas exposições aéreas dos animais simulando uma situação de estresse (VIJAYAN; MOON, 1994). Os níveis de glicose e cortisol aumentaram com a exposição aérea em todos os períodos avaliados (1, 2, 4 e 24 minutos). Os autores observaram um aumento dos níveis de catecolaminas, que estariam associadas a glicogenólise hepática para manutenção dos níveis de glicose na tentativa de manter a homeostase. O cortisol também foi associado com o aumento dos níveis de glicose, além de potencializar outros hormônios, como a epinefrina.

Em um estudo realizado por Norstrud et al (2018), foi constatado que trutas arco-íris expostas ao cortisol, via dieta (500mg/kg), durante 3 semanas, apresentaram

um aumento significativo de 20% na MVR. O nível de cortisol plasmático do grupo controle foi  $0,25 \text{ ng.mL}^{-1}$  enquanto o grupo exposto foi de  $133,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Os autores concluíram que o cortisol é um potente pró-hipertrofico em truta, devido a capacidade adaptativa de remodelar o crescimento do coração da espécie, com aumentos em marcadores de hipertrofia como as proteínas “*slow myosin light chain 2*” e “*ventricular myosin heavy chain*”.

De maneira semelhante, Johansen e colaboradores (2011) dividiram trutas arco-íris em dois grupos (alta resposta e baixa resposta ao cortisol) por meio do confinamento por 3 horas ao longo de 5 meses consecutivos. O grupo de alta resposta ao cortisol exibiu um aumento de 33% na MVR. Os autores acreditam que o aumento da MVR está associado com a hipertrofia ventricular, provavelmente causada por um mecanismo compensatório (FARREL et al., 1988).

O cortisol também foi associado a efeitos inotrópicos positivos no coração de mamíferos (YANO et al., 1994; WEHLING, 1997) e de anfíbios (HAJDU; SZENT-GYORGY, 1952). Farrar e Rodnick (2004) avaliaram os efeitos do cortisol em tiras ventriculares de truta arco-íris e constataram aumento da performance na contratilidade miocárdica *in vitro*. Os exemplares de truta arco-íris também apresentaram uma relação força-frequência negativa, com a Fc decaindo em frequências acima de 0,5 Hz, além do aumento de Fc provocado pelo cortisol conforme dito anteriormente.

Em outro estudo envolvendo fêmeas de tilápia-do-Nilo, foi verificado o potencial de disfunção endócrina causada pelo alumínio ( $0,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em águas neutras ( $\text{pH} \cong 7,0$ ) e ácidas ( $\text{pH} \cong 5,7$ ). Foram encontrados valores de proteína plasmática menores e níveis de cortisol plasmático maiores nos animais expostos ao alumínio. Acompanhado desses resultados evidentes de estresse, foi detectado uma aceleração da mobilização e deposição de lipídios do fígado para os ovários, diminuindo as proteínas nos ovos e do plasma (CORREIA et al., 2010). Dessa forma, os autores concluíram que o alumínio é um agente estressor em fêmeas maduras de tilápia. Na tentativa de desintoxicação do organismo, os ovos podem ser prejudicados, sendo assim, o alumínio foi considerado um disruptor endócrino.

Outros importantes indicadores de estresse no organismo são as atividades enzimáticas envolvidas nos sistemas antioxidantes, como SOD, CAT, GST, GPx e não enzimáticos, como a GSH, assim como os níveis de peroxidação lipídica (LPO) e de concentração de proteína carbonilada (PC). No presente estudo foi verificado uma



redução significativa de 24% na GSH no sangue total de animais expostos ao MPAS, acompanhado de aumentos significativos nos níveis de LPO e de PC no plasma. Estes resultados indicam que os animais expostos ao MPAS sofreram estresse oxidativo devido a exposição ao pool de metais e a baixa concentração de GSH pode indicar a tentativa constante e insuficiente de impedir o estresse oxidativo celular, ou simplesmente a ineficácia de regeneração da GSH no organismo. Elia et al (2013) ressaltam que a diminuição da GSH limita a capacidade da célula em sequestrar radicais livres, e, por consequência, aumenta o potencial oxidativo. Em situações de estresse intenso a GSH pode ser perdida de maneira irreversível, permanecendo na forma oxidada (UHLIG; WENDEL, 1992). Este é o cenário que ocorreu no sangue das tilápias expostas ao MPAS na concentração de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ .

O mesmo aconteceu em tilápias-do-Nilo do rio Kali, na Índia, onde a contaminação por crômio ( $0,29 \text{ mg.L}^{-1}$ ), níquel ( $0,54 \text{ mg.L}^{-1}$ ), chumbo ( $0,48 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e cádmio ( $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ ) levou a uma redução da GSH nas brânquias, fígado, cérebro e rim de *Channa striatus* e *Heteropneustes fossilis* (FATIMA et al., 2015). A LPO e a PC foram surpreendentemente maiores nos animais expostos em todos os órgãos estudados, sendo que em alguns casos ela mais que triplicou o seu valor (FATIMA et al., 2015). O estresse oxidativo causado pelos metais ocorre pela ineficiência das defesas antioxidantes em neutralizar os efeitos tóxicos e oxidantes dos metais. Os baixos níveis da GSH indicam um estado oxidante das células e remetem, novamente, ao estresse intenso e na falha das defesas antioxidantes em neutralizar os efeitos de metais, principalmente quando estão presentes em altas concentrações.

Em um estudo conduzido por Abdel-Khalek et al (2015), tilápias-do-Nilo foram expostas a partículas e nanopartículas de zinco. As partículas normais de zinco totalizaram  $0,68 \text{ g.L}^{-1}$  e as nanopartículas  $0,09 \text{ g.L}^{-1}$ , as exposições duraram 7, 14 e 28 dias. Um dos parâmetros avaliados pelos autores foi a GSH no fígado e brânquias, que reduziu drasticamente nos grupos expostos, principalmente com 14 e 21 dias de exposição. Neste mesmo estudo os níveis de proteínas plasmáticas totais foram reduzidos, acompanhados por um aumento do nível de glicose, semelhante aos estudos apresentados anteriormente e com os resultados deste presente estudo. Os autores concluíram que a GSH é um importante protetor contra o aumento do número de ERO, e a sua redução pode estar associada a maior utilização da mesma (convertida em glutathiona oxidada) na tentativa de reduzir os danos causados pelos metais (ABDEL-KHALEK et al., 2015). Não se pode descartar a hipótese de que os

baixos níveis de GSH possam estar relacionados a ineficiência do mecanismo de regeneração da GSH (XILDEREM et al., 2011).

Um dos maiores contribuintes para a perda das funções celulares em condição de estresse é a peroxidação lipídica (STOREY, 1996). Algumas das implicações da LPO, são: alteração na estrutura de membranas celulares, alteração do fluxo iônico, perda de seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas, alteração do DNA e oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (BARBER; HARRIS, 1994). Diversos estudos mostram que a LPO em organismos aquáticos ocorre devido a presença dos mais diversos tipos de poluentes ambientais, incluindo os metais (PLOCH et al., 1999; WILHELM-FILHO et al., 2001). De acordo com Shaeter et al (1994), os aumentos no número de grupamentos carbonil (proteína carbonilada – PC) estão diretamente relacionados com danos proteicos causado pelo estresse oxidativo, assim o conteúdo de PC é utilizado como avaliação do dano oxidativo proteico (FAGAN et al., 1999). Nesse presente estudo o nível de PC foi muito superior no grupo exposto ao MPAS, confirmando, portanto, a ocorrência de estresse oxidativo.

Em um estudo realizado por Osório et al (2014), avaliou-se a influência de diferentes áreas (agricultura, urbana e estuarina) na espécie neotropical *Geophagus brasiliensis*. Os resultados indicaram que tanto a LPO como a PC no sangue de *G. brasiliensis* foram maiores nos animais coletados das áreas urbanas e de agricultura. Foram encontrados pontos de necrose no fígado e no cérebro. Inflamações no fígado podem gerar danos hepáticos (FORLENZA et al., 2008) e liberar proteases que danificam membranas de lipídios, proteínas e o próprio DNA, ocorrendo a necrose. A análise de metais nos sedimentos indicou a presença de As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Se e Zn, muitos desses metais fazem parte da composição do MPAS e as possibilidades de danos causados por ele podem ser semelhantes ao encontrado neste estudo.

Os níveis de LPO, PC e GSH no coração não indicaram estresse oxidativo nesse órgão. Diversos estudos analisam os efeitos de xenobióticos nos biomarcadores de estresse oxidativo em peixes e outros vertebrados aquáticos, sendo que a maioria das vezes as respostas são tecido-específicas (COSTA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009). Em outros estudos o coração é apresentado como vulnerável a intoxicação por metais, com alteração da função cardíaca (TORT; MADSEN, 1991; WANG et al., 1999). No presente estudo, apesar de não ter aparentado ocorrer estresse oxidativo no coração, foi observado alteração da função cardíaca com o aumento da Fc e CBC e da redução do TPT e THR, indicando que os

efeitos dos metais podem estar associados a regulação  $\beta$ -adrenérgica, mas não necessariamente a danos oxidativos.

As alterações bioquímicas, hematológicas e as respostas fisiológicas encontradas no presente estudo possuem implicações ecológicas. De acordo com Moyle e Leidy (1992), os agentes de redução do número de espécies de peixes podem ser divididos em 5 categorias, sendo elas: 1) competição pela água; 2) alterações no habitat; 3) poluição; 4) introdução de espécies exóticas, e; 5) superexploração comercial. As diferentes categorias funcionam como uma cadeia de processos, uma podendo levar a potencialização de outra. Dessa forma, é importante descrever os possíveis impactos ecológicos do MPAS na tilápia-do-Nilo.

As respostas cardíacas de *O. niloticus* frente a exposição ao MPAS, sobretudo na maior concentração, podem influenciar no desempenho animal e no seu comportamento no ambiente. Conforme observado, os elevados valores de Fc e os menores tempos para contração e relaxamento indicam que o animal, em um ambiente fechado e controlado, precisa manter altos níveis de bombeamento sanguíneo para que oxigênio e nutrientes sejam distribuídos de maneira eficiente por todo seu corpo, suprimindo suas necessidades frente à exposição do MPAS. Algumas respostas aos efeitos tóxicos do MPAS podem ser, por exemplo, redução na taxa de crescimento do indivíduo (massa corpórea reduzida), redução nas taxas de reprodução (abundância populacional reduzida) e busca por novos habitats, forçando a espécie a realizar “*trade offs*” para se adaptar e sobreviver (TILMAN, 2004). Nesse sentido Souza et al. (2018), também apontam mecanismos adaptativos exibidos pela espécie *Centropomus parallelus*, popularmente chamado de robalo-peva, em resposta a acumulação de metais e metaloides em brânquias, músculo branco, rins e hepatopancreas. Os autores concluíram que as brânquias e os rins são as principais vias de excreção dos metais, sendo órgãos importantes para a desintoxicação. No entanto as respostas dos órgãos ao acúmulo de metais possuem custos energéticos que podem limitar a manutenção da espécie a longo prazo.

Em exposições a baixas e altas concentrações de cobre ( $0,004 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e zinco ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tilápias-do-Nilo sofreram reduções em suas taxas de crescimento. Na concentração mais elevada de cobre a redução da taxa de crescimento foi de 12%, enquanto a redução na taxa de crescimento nos indivíduos expostos ao zinco foi de 17% e 27% nas concentrações baixa e alta, respectivamente, reduzindo significativamente o ganho de massa corpórea de indivíduos expostos aos

metais (ABDEL-GAWAD et al., 2020). Portanto, a redução nas taxas de crescimento de animais expostos a metais tende a ser menor, devido às trocas (“*trade offs*”) que os animais precisam realizar para se adaptar e sobreviver.

Para manter a demanda elevada de oxigênio e nutrientes, o animal necessita de uma alocação maior de energia para atender suas necessidades fisiológicas, o que pode impactar as atividades de forrageamento, alimentação, escape de predadores e reprodução. A manutenção de elevados valores de Fc e CBC dos animais expostos, *per si*, já demanda um maior custo energético para o animal. A contratilidade cardíaca depende da manutenção de alto potencial de fosforilação das miofibrilas, sendo que o requerimento energético do músculo cardíaco é atendido principalmente pela fosforilação oxidativa mitocondrial (BIRKEDAL & GESSER, 2004).

No ambiente natural os animais podem realizar uma seleção das melhores maneiras para contornar os efeitos de determinado agente poluente, exibindo, por exemplo, uma resposta de fuga. A busca por novos habitats em decorrência da degradação e destruição de habitats naturais pode levar ao desequilíbrio ambiental, afetando os serviços ecossistêmicos e os bens econômicos e ecológicos para humanos (DOBSON et al., 2006). Nesse processo, a tilápia, sendo uma espécie exótica e invasora pode acarretar na exclusão de outras espécies nativas, como ocorre na Bacia Igarapé Fortaleza, no Amapá, em que a introdução de tilápia gerou redução na densidade populacional em espécies de ciclídeos nativos (BITTENCOURT et al., 2014). O mesmo cenário ocorre nos lagos Vitória e Kyogo, na África, onde a invasão de *O. niloticus* ocasionou a redução de populações nativas de *Oreochromis esculentus* e *Oreochromis variabilis* devido à forte dominância da espécie invasora (BWANIKA et al., 2006).

A competição por recursos e territórios pode, por exemplo, diminuir drasticamente os recursos específicos que determinada espécie utiliza para sobreviver (sobreposição de nichos), levando ao declínio populacional. De acordo com Crooks et al (2011), a poluição aquática pode aumentar o sucesso de espécies invasoras. Um dos possíveis efeitos ecológicos do MPAS pode ser, por exemplo, a fuga e a busca por novos habitats não contaminados. Outra possibilidade é a permanência da espécie no ambiente devido ao seu grau de tolerância, esgotando os recursos e impossibilitando a chegada de novas espécies. Dessa forma, Attayde et al. (2007) constataram que a tilápia-do-Nilo é uma espécie exótica e invasora bem-sucedida, graças a sua plasticidade trófica e alta tolerância às variações ambientais.

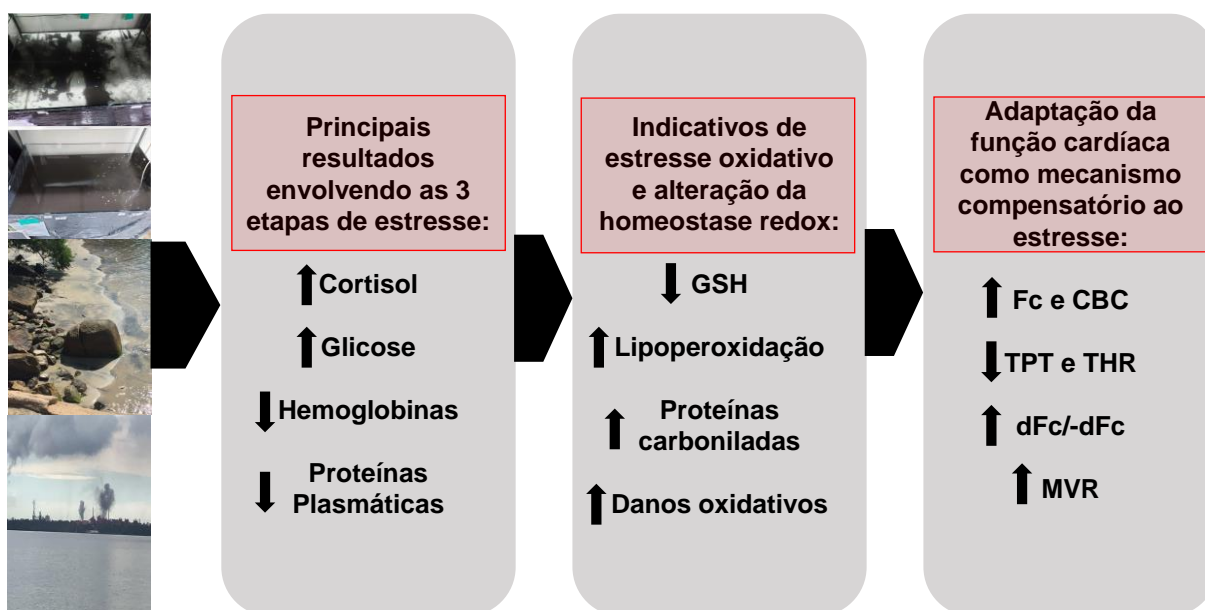
Aliado aos cenários descritos anteriormente, Attayde et al. (2007) mostraram que comunidades de microcrustáceos planctônicos foram reduzidas devido à pressão da população de tilápia, indicando que mesmo indiretamente a tilápia é capaz de exercer dominância sobre espécies nativas por meio do esgotamento de recursos e alterações nas características da água, como a redução da transparência. Esses efeitos podem afetar negativamente o recrutamento de outras espécies, principalmente as tropicais brasileiras.

Dependendo da estratégia adaptativa utilizada pela tilápia-do-Nilo, a tolerância/intolerância ao MPAS pode levar a problemas para a própria espécie e/ou para as demais espécies, o que pode afetar de diversas maneiras outros níveis tróficos (GU et al., 2015).

Em um estudo realizado na China por Gu et al. (2015), foram verificados os impactos da introdução da espécie invasora tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, na pesca dos principais rios da província de Guangdong. O índice de pesca por barco foi menor de acordo com o aumento da presença de tilápias. Além disso, a espécie invasora é uma forte competidora de recursos com a carpa de lama (espécie nativa), *Cirrhinus molitorella*, devido aos hábitos e dietas semelhantes. A abundância de tilápias levou a uma sobrepesca das espécies nativas, devido ao seu baixo valor comercial e nutritivo quando comparado às demais, reduzindo as populações nativas. Os impactos da introdução de espécies exóticas e invasoras não se limitam apenas aos ecológicos, mas também aos sociais e econômicos.

É importante salientar que as respostas fisiológicas e as alterações bioquímicas exibidas frente a exposição da complexidade de metais, metaloides e nanopartículas constituintes do MPAS têm um custo energético, que pode levar a um efeito negativo na taxa de crescimento e reprodução impactando a manutenção e conservação das espécies de teleósteos, embora os efeitos de uma exposição crônica ainda não tenham sido investigados. É evidente, assim, que o MPAS emitido de maneira não controlada, é capaz de impactar a biota aquática a longo prazo, mesmo que espécies resistentes consigam exibir mecanismos adaptativos que as tornam capazes de tolerar tal contaminação. A figura 52 sumariza os principais resultados encontrados neste trabalho.

**Figura 52** - Síntese dos principais resultados encontrados no trabalho



Síntese dos principais resultados encontrados no presente trabalho. **Fonte:** elaborado pelo autor.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho a partir da análise da contratilidade miocárdica *ex vivo* de tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*, em condição controle e após as exposições por 96 horas ao MPAS, na concentração de 0,01 g.L<sup>-1</sup>, 0,1 g.L<sup>-1</sup> e 1,0 g.L<sup>-1</sup>, aliados às análises dos biomarcadores hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo, permitiram extrair as seguintes conclusões:

1. As respostas cardíacas foram dose-dependentes: a) a menor concentração de MPAS não causou efeitos inotrópico e/ou lusitrópico positivos; b) a concentração intermediária reduziu o TPT e o THR em frequências de estimulação mais baixas além de induzir uma relação força-frequência bifásica; c) a maior concentração induziu um efeito inotrópico positivo pronunciado, além do aumento das taxas de contração e relaxamento.
2. A exposição de tiras ventriculares de *O. niloticus* a maior concentração de MPAS apresentou um efeito inotrópico positivo, tornando a contração miocárdica mais forte e mais rápida, além de induzir um efeito lusitrópico positivo melhorando a capacidade de relaxamento do músculo ventricular. Tais alterações resultaram em um aumento da CBC e são decorrentes do aumento

das catecolaminas, cuja liberação foi induzida pelo estresse após a exposição ao MPAS. As ações das catecolaminas aumentaram a eficiência do acoplamento excitação-contração e atuaram como mecanismo compensatório frente a essa situação adversa.

3. As pausas diastólicas de 10, 30, 60 e 300 segundos causaram decaimento pós-pausa da Fc em todos os grupos experimentais, principalmente nas pausas de 60 e 300 segundos, indicando um papel proeminente do NCX no acoplamento excitação-contração e na extrusão do cálcio. Nos grupos expostos ao MPAS houve uma acentuação no decaimento pós-pausa, provavelmente relacionado a alteração da atividade do NCX por meio da ação direta ou indireta dos metais.
4. A CBC do grupo exposto a maior concentração de MPAS aumentou de acordo com os valores de Fc. O aumento da CBC é possivelmente um mecanismo compensatório e está relacionado com a maior demanda de oxigênio, visto que a exposição ao MPAS causou estresse oxidativo e reduções nos níveis de hemoglobina no sangue das tilápias expostas, o que reflete danos oxidativos em tecidos e prejuízos no transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos, respectivamente. Para a manutenção de um débito cardíaco adequado durante alterações metabólicas e frente a agentes estressores, o sistema cardiovascular pode lançar mão de ajustes tanto no volume sistólico, por meio de alterações na força de contração, quanto na frequência cardíaca. A estratégia adotada pelas tilápias expostas ao MPAS foi aumentar a contratilidade para a manutenção de um débito cardíaco necessário para manter os processos fisiológicos e garantir a sobrevivência do animal durante a exposição aguda ao MPAS.
5. A exposição a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de MPAS caracterizou uma situação típica de estresse em *O. niloticus* conforme comprovado pelos níveis plasmáticos elevados de cortisol e glicose e concomitante redução de proteínas plasmáticas totais. A tentativa de manter a homeostase levou ao aumento de cortisol no sangue, adaptando a função cardíaca (descrita acima) e aumentando os níveis de glicose para atender as demandas energéticas nessa situação adversa. Para finalizar as etapas que caracterizam o estresse, observamos reduções nas proteínas plasmáticas totais, indicando uma possível depressão do sistema imunológico e comprometimento da saúde do animal.

6. A quantificação de metais livres e nanopartículas metálicas na água e no MPAS revelaram uma composição de metais variados, sendo que o Fe, Al, Cu, Zn, Mn e Pb foram encontrados em maiores concentrações. As concentrações desses metais no meio aquoso ultrapassaram os limites estabelecidos pela resolução CONAMA Nº 357 de 2005.
7. Os índices hepatossomático (IHS) e massa ventricular relativa (MRV) dos animais expostos a 1,0 g.L<sup>-1</sup> de MPAS sugerem possíveis danos no fígado e coração como hiperplasia e hipertrofia, causados pelo desenvolvimento de estresse, ou ainda pela tentativa contínua de desintoxicação do animal pelo fígado e pela atividade excessiva do coração em entregar substâncias essenciais aos demais tecidos. O aumento da MVR pode ser produto dos níveis de cortisol como resposta ao estresse e pode ter contribuído também para a melhoria do acoplamento excitação-contração conforme descrito acima.
8. A exposição a maior concentração de MPAS induziu estresse oxidativo no sangue e plasma de *O. niloticus*, mas não no tecido cardíaco. O estresse oxidativo induzido pelos efeitos tóxicos do MPAS foram capazes de comprometer a homeostase plasmática e a tentativa de neutralizar a sobrecarga das ERO não foram suficientes. Assim, a alteração da função cardíaca parece estar associada a resposta ao estresse.
9. A exposição a maior concentração de MPAS também não alterou a expressão do NCX, o que indica que o inotropismo e lusitropismo positivos causados pelo MPAS são decorrentes da ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
10. A tilápia-do-Nilo, espécie exótica e de extrema resistência, foi capaz de desenvolver estratégias adaptativas para sobreviver a exposição aguda de MPAS, mesmo na maior concentração. O aumento da Fc e CBC são mecanismos compensatórios causados pelas alterações fisiológicas e hormonais decorrentes dos efeitos tóxicos dos metais.

As análises contidas neste trabalho colaboram para o entendimento do funcionamento do MPAS em um organismo modelo, a tilápia-do-Nilo. Tais resultados colaboram com a formulação e regulação de diretrizes que controlam as emissões de MPAS na Região Metropolitana da Grande Vitória, sendo um problema ambiental e público, de interesse de todas as partes da sociedade.



Ressalta-se a importância de avaliar os efeitos do MPAS em exposições prolongadas (crônicas). Os resultados podem ser exacerbados em períodos maiores de exposição. É extremamente necessário avaliar os efeitos do MPAS em espécies nativas, geralmente mais sensíveis aos efeitos tóxicos de contaminantes. Por ser uma espécie exótica, invasora e resistente, a tilápia-do-Nilo possui uma plasticidade ambiental superior que lhe permite fazer ajustes necessários para sua sobrevivência frente aos efeitos do MPAS. Estes efeitos podem ser acentuados em espécies nativas e tropicais, justamente por apresentarem maior sensibilidade e vulnerabilidade em situações adversas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GAWAD, F. K. et al. The Duckweed, *Lemna minor* Modulates Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Water**, v. 12, n. 11, p. 2983, 2020.

ABDEL-TAWWAB, M.; WAFEEK, M. Fluctuations in water temperature affected waterborne cadmium toxicity: hematology, anaerobic glucose pathway, and oxidative stress status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 477, p. 106-111, 2017.

ADEL ABDEL-KHALEK, A. et al. Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 72, p. 113-125, 2015.

AHO, E., VORNANEN, M., 1999. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. **J. Exp. Biol.** 202, 2663–2677.

AL-BALAWI, H. et al. Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its accumulation in these organs of *Clarias gariepinus*. **Braz. arch. biol. technol.** 2013, vol.56, n.2, pp.293-302.

ALLEN, D. G.; KENTISH, J. C. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 17, n. 9, p. 821-840, 1985.

ALVES, D. D. et al. Concentrations of PM<sub>2.5-10</sub> and PM<sub>2.5</sub> and metallic elements around the Schmidt Stream area, in the Sinos River Basin, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4 suppl 2, p. 43–52, 27 nov. 2015.

ANELLI Jr., L.C. **Função cardíaca do teleósteo tropical *Piaractus mesopotamicus*, pacu, submetido a diferentes condições térmicas**. São Carlos, SP. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2002. 64p.

ANELLI Jr., L.C. et al. Effect of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887-Teleostei, Serrasalminae). **Journal of Thermal Biol**, v.29, p.103-113, 2004.

ANGELONE, T. et al. The antihypertensive chromogranin a peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 4780-4793, 2008.

ANTTILA, K. et al. Association between swimming performance, cardiorespiratory morphometry, and thermal tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Frontiers in Marine Science**, v. 1, 16 dez. 2014.

ARICK, D. Q. et al. Effects of nanoparticles on the mechanical functioning of the lung. **Advances in colloid and interface science**, v. 225, p. 218-228, 2015.

ARRIVABENE, H. P. et al. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. **Chemosphere**, v. 127, p. 27–34, maio 2015.

ARRIVABENE, H. P. et al. Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. **Science of The Total Environment**, v. 476–477, p. 496–504, abr. 2014.

ARRIVABENE, H. P. et al. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environmental Pollution**, v. 215, p. 302-313, 2016.

ASK, J A. Comparative aspects of adrenergic receptors in the hearts of lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 76, n. 3, p. 543-552, 1983.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.145, p. 282–287, 2007.

ATLI, G; GROSELL, M. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 176, p. 38-44, 2016.

ATTAYDE, J. L. al. Impacts of introducing Nile tilapia on the fisheries of a tropical reservoir in North-eastern Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 18, n. 6, p. 437-443, 2011.

ATTAYDE, J. L. et al. Os impactos da introdução da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre a estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos do Bioma Caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 450-461, 2007.

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.

AVMA - AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 218, n. 5, p. 670-696, 2001.

BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M. A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 199-205, 2009.

BARBER, D. A.; HARRIS, St. R. Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A Review: The use of antioxidant vitamin supplements to scavenge free radicals could decrease the risk of disease. **American pharmacy**, v. 34, n. 9, p. 26-35, 1994.

BARON, J. S. et al. MEETING ECOLOGICAL AND SOCIETAL NEEDS FOR FRESHWATER. **Ecological Applications**, v. 12, n. 5, p. 1247–1260, out. 2002.

BARTOLOME, J. et al. Organ specificity of neonatal methyl mercury hydroxide poisoning in the rat: Effects on ornithine decarboxylase activity in developing tissues. **Toxicology letters**, v. 13, n. 3-4, p. 277-288, 1982.

BARTON, B. A. Endocrine and metabolic responses of fish to stress. **Int. Assoc. Aquat. Anim. Med. Proc.** **19**, p. 41-55, 1988.

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.

BASS, J. J. et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 27, n. 1, p. 4-25, 2017.

BERS, F.M. **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**, 2<sup>nd</sup> Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991.258p.

BESSEMER, R. A. et al. Cardiorespiratory toxicity of environmentally relevant zinc oxide nanoparticles in the freshwater fish *Catostomus commersonii*. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 7, p. 861-870, 2015.

BEUTLER, E. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. lab. clin. Med.**, v. 61, p. 882-888, 1963.

BILGIN, A.; KONANÇ, M. Umut. Evaluation of surface water quality and heavy metal pollution of Coruh river Basin (Turkey) by multivariate statistical methods. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 12, p. 1-18, 2016.

BIRKEDAL, R.; GESSER, H. Regulation of mitochondrial energy production in cardiac cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative and Physiology B**, v. 174, p. 255-262, 2006.

BITTENCOURT, L. S. et al. Impact of the invasion from Nile tilapia on natives Cichlidae species in tributary of Amazonas River, Brazil. **Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

BITTENCOURT, N. et al. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. **Hemoglobin (g/dl)**, v. 10, n. 3.09, p. 6.58-15.98, 2003.

BOESCH, D. F. Challenges and opportunities for science in reducing nutrient over-enrichment of coastal ecosystems. **Estuaries and Coasts**, v. 25, n. 4, p. 886–900, ago. 2002.

BOONYATUMANOND, R. et al. Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 942–956, ago. 2006.

BOSCOLO, W. R. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**, 2011.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 491 de 19 de novembro de 2018. **Dispõe sobre padrões de qualidade do ar**. 2018.

BRASIL. Resolução CONAMA nº. 001 de 23 de janeiro de 1986. **Dispõe sobre os critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental**, 1986.

BRASIL, Resolução **CONAMA nº357**, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.

BROETTO, T. et al. Relationships between Agriculture, Riparian Vegetation, and Surface Water Quality in Watersheds. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, n. 0, 2017.

BURY, N. R. et al. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. **Aquatic Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-202, 1998.

BWANIKA, G. N. et al. Cascading effects of introduced Nile perch (*Lates niloticus*) on the foraging ecology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecology of freshwater fish**, v. 15, n. 4, p. 470-481, 2006.

CAKMAK, S. et al. Metal composition of fine particulate air pollution and acute changes in cardiorespiratory physiology. **Environmental Pollution**, v. 189, p. 208–214, jun. 2014.

CALLAGHAN, N. I. et al. Cardioprotective mitochondrial binding by hexokinase I is induced by a hyperoxic acute thermal insult in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 224, p. 45-52, 2018.

CALORE, E. E. et al. Morphometric studies of cardiac miocytes of rats chronically treated with an organophosphate. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 66, n. 3, p. 447-450, 2007.

CAMPBELL, N. et al. **Diffuse Pollution. An introduction to the problems and solutions**. London: IWA Publishing, 2004.

CARAFOLI, Er.. Intracellular calcium homeostasis. **Annual review of biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 395-433, 1987.

CARVALHO, T. B.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 807-812, 2008.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet (British edition)**, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1994.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). Padrões de qualidade do ar. Índices de qualidade do ar. 2021. Disponível em: [Padrões de Qualidade do Ar | Qualidade do Ar \(cetesb.sp.gov.br\)](https://www.cetesb.sp.gov.br/Qualidade-do-Ar). Acesso em: abril/2021.

CHAMPNEYS, T.; GENNER, M. J.; IOANNOU, C. C. Invasive Nile tilapia dominates a threatened indigenous tilapia in competition over shelter. **Hydrobiologia**, p. 1-16, 2020.

CHAPMAN, R. A. Control of cardiac contractility at the cellular level. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 245, n. 4, p. H535-H552, 1983.

CHAPPAZ, A. et al. Isotopic Fingerprints of Anthropogenic Molybdenum in Lake Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 20, p. 10934–10940, 16 out. 2012.

CHEN, L. et al. Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): a comparative study with its bulk counterparts. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 91, p. 52-60, 2013.

CHIN, M. et al. A global three-dimensional model of tropospheric sulfate. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 101, n. D13, p. 18667–18690, 20 ago. 1996.

CHU, C. C. et al. Dry deposition study by using dry deposition plate and water surface sampler in Shalu, central Taiwan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 146, n. 1–3, p. 441–451, nov. 2008.

CIRERA, L. et al. Effects of public health interventions on industrial emissions and ambient air in Cartagena, Spain. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 2, p. 152–161, mar. 2009.

CLAUSS, T. M. et al. Hematologic disorders of fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008.

Companhia Nacional de Abastecimento - Conab. **Séries históricas** 1976-2014.

CONRAD, LOYAL L.; TRENDLEY, ROBERT L.; BAXTER, DONALD J. Positive inotropic effect of manganese on dog myocardium. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 210, n. 2, p. 357-359, 1966.

CORREIA, T. G. et al. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 461-466, 2010.

COSTA, M. J. et al. Cardiac tissue function of the teleost fish *Oreochromis niloticus* under different thermal conditions. **Journal of Thermal Biology**, v. 25, n. 5, p. 373-379, 2000.

COYNE, M. D. et al. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 6, p. R1535-R1544, 2000.

CRILLEY, L. R. et al. Source apportionment of fine and coarse particles at a roadside and urban background site in London during the 2012 summer ClearfLo campaign. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 766–778, jan. 2017.

CROOKS, J. A. et al. Aquatic pollution increases the relative success of invasive species. **Biological Invasions**, v. 13, n. 1, p. 165-176, 2011.

CYRINO, J. E. et al. Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *Micropterus salmoides*. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 609-616, 2000.

DAL-MEDICO, S. E. et al. Negative impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 104, p. 168-174, 2014.

DANDAPAT, J. et al. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 101-115, 2000.

DANE, H; ŞİŞMAN, T. Effects of heavy metal pollution on hepatosomatic index and vital organ histology in *Alburnus mossulensis* from Karasu River. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 44, n. 3, p. 607-617, 2020.

DASH, S. R; KUNDU, C. N. Promising opportunities and potential risk of nanoparticle on the society. **IET nanobiotechnology**, v. 14, n. 4, p. 253-260, 2020.

DE ANGELIS, C. Impairment of metabolic performance in nile tilapia, *oreochromis niloticus*, exposed to a sublethal level of atmospheric particulate material. **55º Congresso anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia**. 2020.

ATTAYDE, J. L. et al. Os impactos da introdução da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre a estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos do Bioma Caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 450-461, 2007.

DE PAIVA, M. J. T. R. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da Universidade Estadual de Maringá - EDUEM, 2013.

Determination of the origin and the transfer of metal and metalloids in the trophic chain in mangrove areas using stable isotope analysis. In: **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 597-598.

DOBSON, A. et al. Habitat loss, trophic collapse, and the decline of ecosystem services. **Ecology**, v. 87, n. 8, p. 1915-1924, 2006.

DRABKIN, D. L. The standardization of hemoglobin measurement. **The American journal of the medical sciences**, v. 215, n. 1, p. 110-110, 1948.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Ca<sup>2+</sup> protection from the negative inotropic effect of contraction frequency on teleost hearts. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 156, n. 1, p. 135-142, 1985.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. **Journal of Experimental Biology**, v. 140, n. 1, p. 227-241, 1988.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 221-258, 1994.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H; JOHANSEN, K. Effects of hypoxic adaptation on myocardial performance and metabolism of *Zoarcis viviparus*. **Canadian journal of zoology**, v. 63, n. 4, p. 821-823, 1985.

DUCE, R. A. et al. The atmospheric input of trace species to the world ocean. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 5, n. 3, p. 193–259, set. 1991.

ELIA, A. C. et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 2, p. 162-167, 2003.

EPA (USA Environmental Protection Agency), Creed, J.T., Brockhoff, C.A., Martin, T.D., 1994. Method 200.8, revision 5.4. determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma – mass spectrometry.

EVANS, D. H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental health perspectives**, v. 71, p. 47-58, 1987.



EXLEY, C.; CHAPPELL, J. S.; BIRCHALL, J. D. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. **Journal of theoretical Biology**, v. 151, n. 3, p. 417-428, 1991.

FAGAN, J. M.; SLECZKA, B. G.; SOHAR, I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 31, n. 7, p. 751-757, 1999.

FAGAN, Julie M.; SLECZKA, Bogdan G.; SOHAR, Istvan. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 31, n. 7, p. 751-757, 1999.

FALCÃO, M. G. et al. A ictiofauna como indicador de qualidade ambiental em planícies de maré do complexo estuarino de Paranaguá, Brasil. **Cadernos da Escola de Saúde e Ciências Biológicas**, v. 1, p. 16, jul. 2008.

FANG, G. C. et al. Characteristic Study of Dry Deposition, Concentration, Compositions for Particulates Mass and Ionic Species During Summer and Autumn Season at a Traffic Sampling Site. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 122, n. 1–3, p. 259–273, 1 nov. 2006.

FANG, G. C. et al. Dry deposition of Mn, Zn, Cr, Cu and Pb in particles of sizes of 3 $\mu$ m, 5.6 $\mu$ m and 10 $\mu$ m in central Taiwan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 203–204, p. 158–168, fev. 2012.

FARFEL, M. R. et al. A study of urban housing demolition as a source of lead in ambient dust on sidewalks, streets, and alleys. **Environmental Research**, v. 99, n. 2, p. 204–213, out. 2005.

FARRAR, R S.; RODNICK, K J. Sex-dependent effects of gonadal steroids and cortisol on cardiac contractility in rainbow trout. **Journal of experimental biology**, v. 207, n. 12, p. 2083-2093, 2004.

FARRELL, A. P.; JONES, D. R. The heart. In "Fish Physiology Vol XIA" Ed by WS Hoar, DJ Randall, AP Farrell. 1992.

FATIMA, M. et al. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 176, p. 17-30, 2015.

FENN, M. E. et al. Nitrogen Emissions, Deposition, and Monitoring in the Western United States. **BioScience**, v. 53, n. 4, p. 391, 2003.

FERRO, L. A. Avaliação da função cardíaca in vitro do cascudo *Hypostomus regani* (IHERING, 1905) e dos efeitos da exposição a concentrações subletais do pesticida Fipronil (REGENT 800WG®). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de São Carlos. 2014.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. et al. Effect of paraquat on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus* at two levels of temperature. **Pest Biochem Physiol**, v. 85, p. 97-103, 2006.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. et al. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 103-109, 2007.

FILETTI, F. M. A exposição aguda a alta concentração de cobre prejudica a contratilidade miocárdica: participação das espécies reativas de oxigênio.

FIORESI, M. et al. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 46, n. 2, p. 178-185, 2013.

FIRAT, Ö. et al. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 657-666, 2011.

FLICK, G.; PERRY, S. F. Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater trout. **J. Endocrinol**, v. 120, p. 83-88, 1989.

FORLENZA, M. et al. Differential contribution of neutrophilic granulocytes and macrophages to nitrosative stress in a host-parasite infection model. **Immune Responses of Carp**, v. 45, p. 99, 2008.

GAMPERL, A.K.; WILKINSON, M.; BOUTILIER, R.G.  $\beta$ - ADRENORECEPTORS IN THE Trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart: Characterization, Quantification, and effects of repeated catecholamine exposure. **General and Comparative Endocrinology**, v.95, p.259-272, 1994.

GESSER, H. et al.  $Ca^{2+}$  regulation of heart contractility in Octopus. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 167, n. 7, p. 474-480, 1997.

GHIO, A. J.; CARRAWAY, M. S.; MADDEN, M. C. Composition of Air Pollution Particles and Oxidative Stress in Cells, Tissues, and Living Systems. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 15, n. 1, p. 1–21, jan. 2012.

GOLTERMAN, H.L.P.; CLYMO, R. S. Methods for chemical analysis of fresh waters. IBP Handbook No. 8. **Black Sci. Publ., Oxford and Edin-burgh**, 1969.

GOSS, G. G.; LAURENT, P.; PERRY, S. F. Evidence for a morphological component in acid-base regulation during environmental hypercapnia in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). **Cell and tissue research**, v. 268, n. 3, p. 539-552, 1992.

GOUDSWAARD, P. C.; WITTE, F.; KATUNZI, E. F. B. The tilapiine fish stock of Lake Victoria before and after the Nile perch upsurge. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 4, p. 838-856, 2002.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 1, n. 2, p. 153–164, 2003.

GREENBERG, A.E.; TARAS, M.J.; RAND, M.C. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 14 ed. Illinois: Springfield Bru-El Graphic, 1976. 310 p.

GU, D. E. et al. The impacts of invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the fisheries in the main rivers of Guangdong Province, China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 1-7, 2015.

GWATHMEY, J. K.; MORGAN, J. P. Calcium handling in myocardium from amphibian, avian, and mammalian species: the search for two components. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, n. 1, p. 19-25, 1991.

HAJDU, S.; SZENT-GYORGYI, A. Action of DOC and serum on the frog heart. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 168, n. 1, p. 159-170, 1951.

HANLEY, P. J.; TER KEURS, H. E. D. J.; CANNELL, M. B. Excitation-contraction coupling in the heart and the negative inotropic action of volatile anesthetics. **Anesthesiology**, v. 101, n. 4, p. 999–1014, out. 2004.

HANLEY, P.J.; ter KEURS, H.E.D.J.; CANNELL, M.B. Excitation-contraction coupling in the heart and the negative inotropic action of volatile anesthetics. **Anesthesiol.**, v. 101, n. 4, p. 999-1014, 2004.

HASEGAWA, M. Y. et al. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus Gallus domesticus*) da Linhagem Avian Farm. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 3, p. 203-208, 2002.

HAYAT, N. M. et al. The use of Lates calcarifer as a biomarker for heavy metals detection. **Rendiconti Lincei**, v. 27, n. 3, p. 463–472, set. 2016.

HELLE, K. B. et al. Structural organization of the normal and anoxic heart of *Scyllium stellare*. **Cell and tissue research**, v. 231, n. 2, p. 399-414, 1983.

HENRY, E. F.; MACCORMACK, T. J. Taurine protects cardiac contractility in killifish, *Fundulus heteroclitus*, by enhancing sarcoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup> cycling. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 1, p. 89-99, 2018.

HICKEN, C. E. et al. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 17, p. 7086–7090, 26 abr. 2011.

HILLMAN, S. S. Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. **Journal of comparative physiology**, v. 109, n. 2, p. 199-207, 1976.

HIPKINS, S. F. Adrenergic responses of the cardiovascular system of the eel, *Anguilla australis*, in vivo. **Journal of Experimental Zoology**, v. 235, n. 1, p. 7-20, 1985.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. **Free radical research**, v. 28, n. 6, p. 593-600, 1998.

HOUSTON, A. H. Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health?. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, n. 6, p. 879-894, 1997.

HOVE-MADSEN, L.; GESSER, H. Force frequency relation in the myocardium of rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 159, n. 1, p. 61-69, 1989.

HOVE-MADSEN, L.; LLACH, A.; TORT, L. Quantification of Ca<sup>2+</sup> uptake in the sarcoplasmic reticulum of trout ventricular myocytes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n. 6, p. R2070-R2080, 1998.

HOWARD-WILLIAMS, C.; DAVIES-COLLEY, R.; RUTHERFORD, K. Diffuse pollution and freshwater degradation: New Zealand perspectives. **Issues and Solutions to Diffuse Pollution**, v. 1, n. 1, p. 126-140, 2010.

HUGGETT, R. J. et al. Biomarkers-Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress Lewis. **Boca Raton, FL**, 1992.

IMBROGNO, S. et al. The catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A344-364) modulates myocardial function in fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 21, p. 3636-3643, 2010.

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. Environmental Pollution and the Fish Heart. In: **Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 36p. 373-433.

INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 515-525, 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Séries históricas e estatísticas: efetivo do rebanho de 1974-2009; 2015.

IWAMA, G. K. et al. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, v. 39, n. 6, p. 901-909, 1999.

JIANG, Z.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A. CS; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JOHANSEN, I. B. et al. Cortisol response to stress is associated with myocardial remodeling in salmonid fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 8, p. 1313-1321, 2011.

KATSNELSON, B. A. et al. Force-velocity characteristics of isolated myocardium preparations from rats exposed to subchronic intoxication with lead and cadmium acting separately or in combination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 144, p. 111641, 2020.

KEEN, J. E. et al. Cardiac physiology in tunas. II. Effect of ryanodine, calcium, and adrenaline on force–frequency relationships in atrial strips from skipjack tuna, *Katsuwonus Pelamis*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 6, p. 1211-1217, 1992.

KELLY, S. P.; WOOD, C. M. Cultured gill epithelia from freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*): effect of cortisol and homologous serum supplements from stressed and unstressed fish. **The Journal of membrane biology**, v. 190, n. 1, p. 29-42, 2002.

KIM, C.S.; COYNE, M.D.; GWATHMEY, J.K. Voltage-dependent calcium channels in ventricular cells of rainbow trout: effects of temperature changes in vitro. **American Journal Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 278, p. 1524-1534, 2000.

KIRBY, M. S. et al. Thapsigargin inhibits contraction and Ca<sup>2+</sup> transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 18, p. 12545-12551, 1992.

KORI-SIAKPERE, O.; UBOGU, E. O. Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater fish, *Heteroclaris* sp.(Osteichthyes: Clariidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **The protein protocols handbook**, p. 17-24, 2009.

KUMAR, H. et al. Metallic nanoparticle: a review. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 4, n. 2, p. 3765-3775, 2018.

LAETZ, C. A. et al. Ecotoxicological risk of mixtures. **Aquatic Ecotoxicology**, p. 441-462, 2015.

LAUGHLIN, MAREN R. et al. Regulation of glycogen metabolism in canine myocardium: Effects of insulin and epinephrine in vivo. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 262, n. 6, p. E875-E883, 1992.

LAYLAND, J., YOUNG, I. S.; ALTRINGHAM, J. D. The effect of cycle frequency on the power output of rat papillary muscles in vitro. **Journal of Experimental Biology**198, 1035–1043,1995.

LEE, J. et al. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 68, p. 101-108, 2019.

LEKNES, I. L. Ultrastructure of the parietal pericardium in teleosts. **Journal of anatomy**, v. 138, n. Pt 4, p. 703, 1984.

LEMAŃSKA, K. et al. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 7, p. 869-881, 2001.

LI, K.; LIN, B. Impacts of urbanization and industrialization on energy consumption/CO<sub>2</sub> emissions: Does the level of development matter? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1107–1122, dez. 2015.

LIMA-JUNIOR, S. E.; CARDONE, I. B.; GOITEIN, R. Determination of a method for calculation of Allometric Condition Factor of fish. **Acta Scientiarum: Biological and Health Sciences**, p. 397-400, 2002.

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

LINNÉ, C. Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Vol. 1, pt. 7. 1789.

LIVINGSTONE, D. R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 154, n. 6, p. 427-430, 2003.

LOBOS, M. G. et al. Distribution of Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in liver, gills and muscle of early life stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 102, n. 3, p. 419-424, 2019.

LOPES, A. G. **Efeitos da acidose láctica nos processos da contratilidade cardíaca do teleósteo de água doce matrinxã, Brycon cephalus**. Dissertação de Mestrado—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2009.

MARTINEZ, C. B. R.; et al. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Braz. J. Biol.** [online]. 2004, vol.64, n.4, pp.797-807.

MATIKAINEN, N.; VORNANEN, M. Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. **J. Exp. Biol.**, v. 167, p. 203-220, 1992.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, n. 3, p. 201-212, 1977.

MAZZA, R. et al. Catestatin (chromogranin A344-364) is a novel cardiosuppressive agent: inhibition of isoproterenol and endothelin signaling in the frog heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 1, p. H113-H122, 2008.

MCKENZIE, D. J. et al. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1487, p. 2043–2059, 29 nov. 2007.

MILLIGAN, C. LOUISE; WOOD, CHRIS M. Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of Experimental Biology**, v. 99, n. 1, p. 397-415, 1982.

Mohammed A. A., et al. Ultrastructural effects on gill tissues induced in red tilapia *Oreochromis sp.* by a waterborne lead exposure, **Saudi Journal of Biological Sciences**, Volume 23, Issue 5, 2016.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211-268, 1999.

MONTEIRO, D. A. et al. Impact of waterborne and trophic mercury exposures on cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus* and *Hoplias malabaricus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 201, p. 26–34, out. 2017.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 105-123, 2010.

MONTEIRO, S. M. et al. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 4, p. 375-383, 2005.

MOON, T. W.; FOSTER, G. D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 4, p. 65-100, 1995.

MORO, G. V. et al. Espécies de peixe para piscicultura. **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília: EMBRAPA, p. 28-69, 2013.

MOYLE, P. B.; LEIDY, R. A. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas. In: **Conservation biology**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 127-169.

NAM, J. J. et al. PAHs in background soils from Western Europe: Influence of atmospheric deposition and soil organic matter. **Chemosphere**, v. 70, n. 9, p. 1596–1602, fev. 2008.

NIKINMAA, M. Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. **Journal of comparative physiology**, v. 152, n. 1, p. 67-72, 1983.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NORRIS, D. O. et al. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 71-78, 2000.

NØRSTRUD, Karoline S. et al. Short-term cortisol exposure alters cardiac hypertrophic and non-hypertrophic signalling in a time-dependent manner in rainbow trout. **Biology open**, v. 7, n. 12, 2018.

OLIVEIRA, M. et al. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 70, n. 1, p. 20-26, 2008.

OLSON, H.I.; YEE, N.; SHIELS, H.A.; BRAUNER, C.; FARRELL, A.P. A Comparison of myocardial  $\beta$ -adrenoreceptor density and ligand binding affinity among selected teleost fishes. **Journal of Comparative of Physiology B**, v.170, p. 545-550, 2000.

OSÓRIO, F. H. T. et al. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145-9160, 2014.

PEREIRA, A. C.; DA SILVA, G. Z.; CARBONARI, E. E. **Sustentabilidade, responsabilidade e meio ambiente**. 1. ed. [s.l: s.n.].

PERRY, STEVE F.; REID, SCOTT D. The relationship between beta-adrenoceptors and adrenergic responsiveness in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and eel (*Anguilla rostrata*) erythrocytes. **Journal of experimental biology**, v. 167, n. 1, p. 235-250, 1992.

PINHEIRO, L. M.S et al. Aspectos técnicos da tilapicultura. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, n. 50, p. 75-80, 2006.

PINHO-NETO, C. F. et al. Does sex influence intraspecific aggression and dominance in Nile tilapia juveniles?. **Behavioural processes**, v. 105, p. 15-18, 2014.

PLOCH, S. A. et al. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert-butyl hydroperoxide. **Aquatic toxicology**, v. 46, n. 3-4, p. 231-240, 1999.

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

PORTER, C. M.; JANZ, D. M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 199-206, 2003.



POTT, Ch.; ECKARDT, L.; I GOLDBERGER, J. Triple threat: the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in the pathophysiology of cardiac arrhythmia, ischemia and heart failure. **Current drug targets**, v. 12, n. 5, p. 737-747, 2011.

PROTSENKO, Y. L. et al. Changes in rat myocardium contractility under subchronic intoxication with lead and cadmium salts administered alone or in combination. **Toxicology reports**, v. 7, p. 433-442, 2020.

RANDALL, DJ t; CAMERON, J\_N. Respiratory control of arterial pH as temperature changes in rainbow trout *Salmo gairdneri*. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 225, n. 4, p. 997-1002, 1973.

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

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 357-363, 1994.

RICHARDT, G.; FEDEROLF, G.; HABERMANN, E. Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. **Biochemical pharmacology**, v. 35, n. 8, p. 1331-1335, 1986.

RIMA (Relatório de Impacto Ambiental) UTEI Vitória. **Meio biótico, ambientes aquáticos**. 2007.

RIVAROLI, L. Avaliação da função cardíaca do teleosteo neotropical matrinxã, *Brycon amazonicus*: uma análise matemática e biomolecular. 2011. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

RIVAROLI, L; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Cardiac function of two ecologically distinct Neotropical freshwater fish: Curimbata, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae), and trahira, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 3, p. 322-327, 2006.

RODRIGUES, R. A. R. **Deposição atmosférica na bacia do alto curso do rio paquequer – Parque Nacional da Serra dos órgãos, TERESÓPOLIS, RJ**. Dissertação de Mestrado—Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2006.

ROTHWELL, S.E.; BLACK, S.E.; JERRETT, A.R.; FOSTER, M.E. Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v.140, p.289– 298, 2005.

SANTER, R. M. Morphology and innervation of the fish heart. **Advances in anatomy, embryology, and cell biology**, n. 89, 1985.

SANTOS, J. M. et al. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 27, p. 22026–22039, set. 2017.

SANTOS, J.M., REIS Jr N.C. Caracterização e quantificação de partículas sedimentadas na região da Grande Vitória. **Relatório Técnico Instituto Estadual do Meio Ambiente**. 2011.

SARDANS, J.; RIVAS-UBACH, A.; PEÑUELAS, J. The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 14, n. 1, p. 33–47, fev. 2012.

SATCHELL, G. H. Circulation in fishes. 1971.

SHARMA, R. K.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F. M. Atmospheric deposition of heavy metals (Cu, Zn, Cd and Pb) in Varanasi City, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 142, n. 1–3, p. 269–278, jul. 2008.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 111-121, 2006.

SHIELS, H.; FARRELL, A. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca<sup>2+</sup> to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 11, p. 1607-1621, 1997.

SHIELS, H.A.; FARRELL, A.P. The effect of ryanodine on isometric tension development in isolated ventricular trabeculae from Pacific mackerel (*Scomber japonicus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 125A, p. 331-341, 2000.

SHIELS, H. A.; VORNANEN, M.; FARRELL, A. P. The force–frequency relationship in fish hearts—a review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 811-826, 2002.

SHRIMPTON, J. M.; MCCORMICK, S. D. Responsiveness of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to cortisol is related to gill corticosteroid receptor concentration in juvenile rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 8, p. 987-995, 1999.

SOKOLOVA, I. M.; LANNIG, G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. **Climate Research**, v. 37, n. 2-3, p. 181-201, 2008.

SOLANGI, M. A.; OVERSTREET, R. M. Histopathological changes in two estuarine fishes, *Menidia beryllina* (Cope) and *Trinectes maculatus* (Bloch and Schneider), exposed to crude oil and its water-soluble fractions. **Journal of Fish Diseases**, v. 5, n. 1, p. 13-35, 1982.

SOUZA, I. DA C. et al. Changes in bioaccumulation and translocation patterns between root and leaf of *Avicennia schaueriana* as adaptive response to different levels of

metals in mangrove system. **Marine Pollution Bulletin**, v. 94, n. 1–2, p. 176–184, 2015.

SOUZA, I. DA C. et al. Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish ( *Centropomus parallelus* ) from Neotropical estuaries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 260–269, 2018a.

SOUZA, I. DA C. et al. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 501–511, 2018b.

SOUZA, I. DA C. et al. Matching pollution with adaptive changes in mangrove plants by multivariate statistics. A case study, *Rhizophora mangle* from four neotropical mangroves in Brazil. **Chemosphere**, v. 108, p. 115–124, 2014b.

SOUZA, I DA C. et al. Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: integrating chemical and biological data by chemometrics. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 335–348, 2014a.

SOUZA, I. DA C., Arrivabene, H.P., Craig, C., Midwood, A., Weidle, I., Thornton, B., Elliot, M., Wunderlin, D.A., Monferrán, M.V., Fernandes, M.N., 2016.

SOUZA, I. DA C. et al. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental pollution**, v. 180, p. 136-144, 2013.

SOUZA, I. DA C. et al. Trophic transfer of emerging metallic contaminants in a neotropical mangrove ecosystem food web. **Journal of Hazardous Materials**, v. 408, p. 124424, 2021a.

SOUZA, I. DA C. et al. Atmospheric particulate matter from an industrial area as a source of metal nanoparticle contamination in aquatic ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 753, p. 141976, 2021b.

SOUZA, I. DA C. et al. Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. **Science of The Total Environment**, v. 658, p. 798-808, 2019.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

SUN, X. et al. Cardiac hypertrophy involves both myocyte hypertrophy and hyperplasia in anemic zebrafish. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6596, 2009.

TAVARES-DIAS, M. A introdução da tilápia em ambientes diversos de sua origem e as consequências negativas. **Embrapa Amapá-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2019.

THOMAZ, J. M. Efeito do organofosforado triclorfon (Neguvon®) sobre a função cardio-respiratória da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2008. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

TIBBITS, G. F.; HOVE-MADSEN, Leif; BERS, Donald M. Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. **Canadian journal of zoology**, v. 69, n. 7, p. 2014-2019, 1991.

TIBBITS, G. F.; MOYES, CHRZSTOPHER D.; HOVE-MADSEN, Leif. Excitation–contraction coupling in the teleost heart. **Fish physiology**, v. 12, n. Part A, p. 267-304, 1992.

TILMAN, D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 30, p. 10854-10861, 2004.

TORT, L.; TORRES, P. The effects of sublethal concentrations of cadmium on haematological parameters in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Journal of Fish Biology**, v. 32, n. 2, p. 277-282, 1988.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

TORT, L.; MADSEN, L. H. The effects of the heavy metals cadmium and zinc on the contraction of ventricular fibres in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative**, v. 99, p. 353-356, 1991.

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.

TÜRTSCHER, S. et al. Declining atmospheric deposition of heavy metals over the last three decades is reflected in soil and foliage of 97 beech (*Fagus sylvatica*) stands in the Vienna Woods. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 561–573, nov. 2017.

UEHARA, A. et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. **Cell calcium**, v. 31, n. 2, p. 89-96, 2002.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life sciences**, v. 51, n. 14, p. 1083-1094, 1992.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 64, n. 2, p. 178-189, 2006.

VALLACK, H. W.; SHILLITO, D. E. Suggested guidelines for deposited ambient dust. **Atmospheric Environment**, v. 32, n. 16, p. 2737–2744, ago. 1998.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN VUREN, J. H. J. The plasma proteins of some freshwater fish in their natural environment. **Journal of the Limnological Society of Southern Africa**, v. 6, n. 2, p. 96-100, 1980.

VANOS, J. K.; HEBBERN, C.; CAKMAK, S. Risk assessment for cardiovascular and respiratory mortality due to air pollution and synoptic meteorology in 10 Canadian cities. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 322–332, fev. 2014.

VASSALLO, D. V. et al. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 67, p. 39-45, 1996.

VAZZOLER, A. E. A. M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. **Maringá: Eduem**, v. 196, 1996.

VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 3, p. 379-386, 1994.

VORNANEN, M. Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 272, n. 5, p. R1432-R1440, 1997.

VORNANEN, M.; SHIELS, H. A.; FARRELL, A. P. Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 827-846, 2002.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, p. 555, 29 set. 2010.

WANG, J. et al. Characterization of chemical compositions in size-segregated atmospheric particles during severe haze episodes in three mega-cities of China. **Atmospheric Research**, v. 187, p. 138–146, maio 2017.

WASSERSTROM, J. A.; VITES, A. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd<sup>2+</sup> concentration and temperature. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 277, n. 2, p. H488-H498, 1999.

WDZIĘCZAK, J. et al. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 361-365, 1982.

WEDEMEYER G. A; BARTON B.; MC LEAY D. Stress and acclimation Schreck C, Moyle P. (Ed.). **Methods for fish biology**. Bethesda, American Fisheries Society, 1990. p. 451-489.

WEDEMEYER, G. A. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. **Stress and fish**, p. 247-275, 1981.

WEDEMEYER, G.; BARTON, B. B.; MCLEAY, D. J. Stress and acclimation. 1990.

WEHLING, M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. **Annual review of physiology**, v. 59, n. 1, p. 365-393, 1997.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WHITFIELD, J. Vital signs. **Nature**, v. 411, n. 6841, p. 989–990, 1 jun. 2001.

WILHELM FILHO, D. et al. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, v. 203, n. 1-2, p. 149-158, 2001.

WITESKA, M. Anemia in teleost fishes. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol**, v. 35, n. 4, p. 149, 2015.

WOOD, C. M. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. **Fish physiology**, v. 31, p. 1-51, 2011.

WRIGHT, P. A.; PERRY, S. F.; MOON, T. W. Regulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis by catecholamines in rainbow trout during environmental hypoxia. **Journal of Experimental Biology**, v. 147, n. 1, p. 169-188, 1989.

XIE, Y. et al. Conformational changes of a Ca<sup>2+</sup>-binding domain of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger monitored by FRET in transgenic zebrafish heart. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 2, p. C388-C393, 2008.

YANO, K. et al. Effects of hydrocortisone on transmembrane currents in guinea pig ventricular myocytes: possible evidence for positive inotropism. **Japanese circulation journal**, v. 58, n. 11, p. 836-843, 1994.

YUE, D. T. Intracellular [Ca<sup>2+</sup>] related to rate of force development in twitch contraction of heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 252, n. 4, p. H760-H770, 1987.