



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL**  
**LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO CELULAR**

**ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO EM MACHOS E FÊMEAS DE**  
***Poecilia reticulata* EXPOSTOS A UM EFLUENTE PESQUEIRO**  
**DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA (GO)**

**RAFAEL COSME MACHADO**

**- MESTRANDO -**

**GOIÂNIA, 2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Rafael Cosme Machado

Título do trabalho: Estudo Ecotoxicológico em Machos e Fêmeas de *Poecilia reticulata* Expostos a um Efluente Pesqueiro do Município De Goiânia (GO)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Rafael Cosme Machado  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

Simone M. T. de Sá - Moraes  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 13 / 06 / 2019

1 Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.  
Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

2 A assinatura deve ser escaneada.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL  
LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO CELULAR

**ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO EM MACHOS E FÊMEAS DE  
*Poecilia reticulata* EXPOSTOS A UM EFLUENTE PESQUEIRO  
DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA (GO)**

O presente é apresentado para ser apreciado e avaliado pela banca examinadora de defesa de dissertação, em cumprimento a exigência do PPGBV para obtenção do título de mestre em Biodiversidade Vegetal pelo ICB – UFG.

**Mestrando: Rafael Cosme Machado**

**Orientadora: Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Ina de Souza Nogueira**

**GOIÂNIA, 2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Machado, Rafael Cosme

Estudo Ecotoxicológico em Machos e Fêmeas de *Poecilia reticulata* Expostos a um Efluente Pesqueiro do Município de Goiânia (GO) [manuscrito] / Rafael Cosme Machado. - 2015.

XIX, 148 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais; co orientadora Dra. Ina de Souza Nogueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Contaminação antrópica. 2. Guppy. 3. Ecotoxicologia. 4. Endpoints. 5. Sazonalidade. I. Sabóia-Morais, Simone Maria Teixeira de, orient. II. Título.

CDU 581



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

## ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 030

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO.** – Aos dezoito dias do mês de agosto do ano de dois mil e quinze (18/08/2015), às 09h00min horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais – orientadora; Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi e Prof.Dr. Armando García Rodríguez para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Mini-Auditório do Instituto de Ciências Biológicas IV, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada “ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO EM MACHOS E FÊMEAS DE *Poecilia reticulata* EXPOSTOS A UM EFLUENTE PESQUEIRO DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA (GO).” em nível de mestrado, área de concentração em Botânica, de autoria de **RAFAEL COSME MACHADO**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1048/2011 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE VEGETAL, na área de concentração em Botânica pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na

secretaria do PPGBV da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções, em trinta dias a contar da data da defesa. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científicos oriundos dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às \_\_\_\_\_ horas a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, assistente administrativa do PPGBV lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

*Simone M. T. de Sabóia-Morais*

Prof<sup>ª</sup>.Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais  
Presidente da Banca  
Universidade Federal de Goiás

*Vera Aparecida Saddi*

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi  
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

*Armando García Rodríguez*

Prof.Dr. Armando García Rodríguez  
Universidade Federal de Goiás

## COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA

### MEMBROS EFETIVOS:

*Simone Sabóia-Morais*

---

Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais  
Orientadora junto ao PPGBV e Presidente da Banca

---

Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi (EXTERNO)

Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde–  
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

---

Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez

Depto de Bioquímica e Biologia Molecular – UFG

### MEMBROS SUPLENTES:

---

Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior (EXTERNO)

Depto de Fisiologia Animal – Universidade de Brasília

---

Prof. Dra. Lee Chen Chen

Depto de Biologia Geral – UFG

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás pela possibilidade de realização dos estudos que se concretizarão com a obtenção do título de mestre.

Agradeço a minha mãe, por sempre tentar me proporcionar tudo o que não pode ter durante a sua vida, fazendo assim com que muitos dos meus sonhos se tornassem realidade, me ensinando a seguir por caminhos que, as vezes, não eram tão bonitos quanto eu imaginava.

Agradeço aos meus irmãos e a minha irmã por terem me ensinado com suas “birras”, “choros” e “gritarias” o que é o amor incondicional, por todos os momentos de felicidade que me foram proporcionados ao me recordar de suas palavras me dizendo “... te amo maninho” e ainda por sempre me fazerem lembrar e acreditar que tudo o que queremos é possível, basta lutar.

À minha orientadora, Professora Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais, destino agradecimentos especiais, por seus ensinamentos, conselhos e incentivos, que tanto me são e me serão úteis durante a vida profissional, por sua competência, compreensão, participação com coletas, investimentos, ajudas pessoais, discussões humanas e científicas, correções, revisões e sugestões que fizeram com que concluíssemos juntos essa etapa do nosso estudo.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Ina de Souza Nogueira por me aceitar como seu aluno e por contribuir com seus ensinamentos, paciência, disponibilidade, análise do material de coleta, assim como pela atenção fornecida em todos os momentos em que a procurava. Agradeço ainda por todo auxílio, contribuição técnica e científica fundamentais para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao meu companheiro Bruno Silva Martins, pela paciência que teve comigo nos meus momentos de desespero, pela grande ajuda na padronização dos procedimentos histotecnológicos e pela compreensão em todos os momentos que não me fiz presente, assim como a toda a sua família que sempre me apoiou fornecendo palavras positivas e votos de confiança para que eu pudesse continuar na busca dessa longa caminhada do ensino e pesquisa acadêmica.

Ao mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Alex Lucas Hanusch, meu amigo e “irmão” que, em muitos momentos deixou de realizar suas atividades para que pudesse me auxiliar no desenvolvimento das várias etapas desse estudo, além da disponibilidade de me ajudar em todas as horas em que o procurei e até aquelas as quais me distanciava. Agradeço ainda pela companhia em todos os momentos, principalmente, os de grande dificuldade, tristeza e sufoco. Também destino

agradecimentos especiais a Sr<sup>a</sup>. Danilva Lucas Hanusch, que foi muito importante durante vários “específicos” momentos de sufoco e sempre se preocupou comigo e com as minhas viagens a estudo durante todo mestrado. Muito Obrigado!

Ao Professor Dr. Osmino Rodrigues Pires Júnior do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília por disponibilizar do seu tempo, atenção, paciência e pelos cuidados que sempre demonstrou ter durante minhas etapas experimentais na Universidade de Brasília (UnB), assim como por ter aceitado ser membro efetivo durante o exame pré-banca e na defesa de minha dissertação, contribuindo com seus conhecimentos sobre Toxinologia com ênfase em cianotoxinas.

Ao Professor Dr. César Koppe Grisólia, do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade de Brasília, por me receber tão bem em seu laboratório, disponibilizando seu espaço de trabalho e pesquisa, assim como seus equipamentos laboratoriais para que eu pudesse utilizar.

Ao doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais Roberto Araújo Bezerra, pela amizade e pela incansável ajuda em todas as etapas experimentais desse estudo, fornecendo ensinamento, materiais e equipamentos para que vários dos objetivos desse estudo pudessem ser alcançados.

À mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, Lilibete Pereira de Oliveira, pela grande amiga que sempre se mostrou, desde as dificuldades com as disciplinas de nossa graduação até a “luta pela sobrevivência em Brasília”, e ao mestrando Carlos Correa Santana, amigos aos quais eu destino os mais sinceros agradecimentos.

À Professora MSc. Marta Regina Magalhães do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela paciência, tempo, atenção e cuidado destinados a mim, assim como pelas incansáveis e diurnas colaborações na obtenção das amostras utilizadas nesse estudo.

À Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira Lacerda e ao mestrando Rafael Veloso Pena, do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética Humana da Universidade Federal de Goiás, por ambos me aceitarem em seu laboratório e confiarem em mim para que, mesmo em suas ausências eu pudesse desenvolver parte das etapas experimentais desse estudo.

À Professora Doutora Silvana Petrofeza da Silva, do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos da Universidade Federal de Goiás, por toda atenção e disponibilidade concedidas, assim como por me permitir a realização dos ensaios enzimáticos em seu laboratório.

À Pesquisadora MSc. Taryana Coelho Sales Barbosa do Instituto do Trópico Subúmido da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelas colaborações com as coletas dos animais, assim como pelos materiais de laboratório que me foram cedidos.

À Técnica em BIODIAGNÓSTICO Letícia Silva Mesquita Carvalho que foi responsável pela confecção das primeiras lâminas histológicas e que me ensinou os mais diversos procedimentos histotecnológicos, sempre prezando pela qualidade de todo o material. Muito obrigado por todos os ensinamentos que me foram passados, pois, sem eles, eu não teria conseguido realizar e otimizar as metodologias em tempo hábil.

Ao Citoescrutinador e Técnico em Histologia Amilton Souza Bastos pela paciência, pelos conhecimentos e por disponibilizar do seu tempo para me auxiliar na compreensão dos métodos para a execução do estudo histoquímico e da rotina dos processos histológicos em geral.

Aos(as) acadêmicos(as) do Curso de Ciências Biológicas Natália Gouveia Rodrigues, Raquel de Andrade Silva, Jéssica Custódio da Silva Rabelo, Lorena Alves Mesquita, Wanderson Junio Araújo dos Santos, Caroline Almeida Jansen, João Paulo e ao mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal Antônio de Freitas Gonçalves Júnior, integrantes do Laboratório de Comportamento Celular, pelo auxílio do desenvolvimento desse estudo e pela compreensão na busca da padronização das atividades laboratoriais.

À Professora Doutora Sirlene Felisberto Rodrigues por aceitar participar do exame pré-banca, proporcionando discussões e sugestões que serviram para o crescimento e melhora desse estudo, assim como para meu aprendizado e busca por melhores resultados.

Ao Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto à Profa. Dra. Vera Lucia Freire Bastos e ao Prof. Dr. Frederico Freire Bastos do Laboratório de Bioquímica Toxicológica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que tão bem me acolheram, proporcionando importantes momentos de aprendizagem acadêmica, científica, cultural e humana, além de me possibilitarem conhecer (quase em período integral) essa ciência incrível que é a enzimologia na forma dos grandes pesquisadores e educadores que são. Muito obrigado por TUDO!

À doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente Ana Carolina Volpato Zanandrea e ao biólogo, mestrando Lauro Ribeiro de Souza Neto, ambos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela amizade e atenção que sempre tiveram comigo e por terem compartilhado, na teoria e na prática, “um pouco” de seus conhecimentos e vivências laboratoriais sanando muitas das minhas dúvidas.

Aos Professores Lin Machado de Lima e Roosevelt Aguiar Dias, ambos do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela amizade, por me auxiliarem na

execução de parte dos experimentos e por me disponibilizarem todo o material de apoio necessário para a compreensão padronização dos ensaios enzimáticos.

Aos examinadores externos Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Universidade Federal de Goiás) e Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde (Pontifícia Universidade Católica de Goiás), por disporem do seu tempo fornecendo todas as correções sugeridas as quais foram de grande valia para a melhora desse estudo.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, pela avaliação do projeto, críticas e sugestões.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

À **FAPEG** (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás) pelo apoio financeiro concedido.

Aos meus demais amigos, discentes, do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Frederico Rocha Rodrigues Alves, Lorena Lana Camelo Antunes e Renato Silva Oliveira, dos quais sempre me lembrarei.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, da Universidade Federal de Goiás, pelos conhecimentos repassados com tanto afinho.

E a todos que de uma forma direta ou indireta colaboraram na realização e conclusão desse estudo, minha eterna gratidão e reconhecimento.

“Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu mesmo vejo-me como um pobre garoto que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim.”

(Isaac Newton)

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas .....	IX
Lista de Figuras .....	X
Lista de Símbolos .....	XV
Lista de Siglas .....	XVI
Resumo .....	XVIII
Abstract .....	XIX
1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1. Recursos hídricos .....	3
2.2. Ecotoxicologia .....	4
2.3. Eutrofização .....	5
2.4. Efluentes aquáticos .....	7
2.5. Divisão Cyanobacteria .....	8
2.5.1. Gênero <i>Microcystis</i> sp. ....	9
2.5.2. Gênero <i>Anabaena</i> sp. ....	10
2.6. Cianotoxinas .....	10
2.6.1. Microcistinas (MCYSTs) .....	12
2.7. Métodos de avaliação da poluição aquática .....	12
2.7.1. Parâmetros de análise química .....	13
2.7.2. Genotoxicidade de xenobióticos .....	14
2.7.3. Atividade da catalase, carboxilesterase e glutatona-S-transferase ....	15
2.7.4. <i>Poecilia reticulata</i> como modelo biológico .....	17
3. Justificativa .....	19
4. Objetivos .....	20
4.1. Objetivo Geral .....	20
4.2. Objetivos Específicos .....	20
5. Área de Estudo .....	20
6. Material e Métodos .....	22
6.1. Parâmetros Físico-Químicos, Inorgânicos e Orgânicos .....	23
6.2. Análise Qualitativa e Quantitativa do Fitoplâncton .....	24
6.3. Caracterização da Microcistina L-R por HPLC.....	25

6.4.	Dieta dos Espécimes de <i>Poecilia reticulata</i> .....	26
6.5.	Aclimação .....	26
6.6.	Bioensaios para a avaliação da toxicidade do efluente .....	28
6.6.1.	Concentração letal do cobre (Cu <sup>2+</sup> ) .....	29
6.6.2.	Parâmetros comportamentais.....	29
6.6.3.	Análise morfométrica e histoquímica.....	30
6.6.4.	Ensaio cometa.....	31
6.6.5.	Dosagem de proteína e ensaios enzimáticos.....	33
6.7.	Análise estatística .....	34
7.	Resultados .....	35
7.1.	Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e orgânicos .....	35
7.2.	Análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton .....	37
7.3.	Caracterização da microcistina L-R por HPLC .....	39
7.4.	Bioensaios para a avaliação da toxicidade do efluente .....	40
7.4.1.	Concentração letal do cobre (Cu <sup>2+</sup> ).....	40
7.4.2.	Parâmetros comportamentais.....	41
7.4.3.	Análise morfométrica e histoquímica.....	42
7.4.4.	Ensaio cometa.....	48
7.4.5.	Parâmetros cinéticos enzimáticos e atividade específica.....	50
7.4.5.1.	Atividade da catalase (CAT).....	50
7.4.5.2.	Atividade da carboxilesterase (CarbE).....	51
7.4.5.3.	Atividade da glutationa-S-transferase (GST).....	53
8.	Discussão .....	54
8.1.	Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e orgânicos .....	54
8.2.	Análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton .....	56
8.3.	Caracterização da microcistina L-R no pesqueiro.....	58
8.4.	Toxicidade e disfunções comportamentais.....	60
8.5.	Histopatologias associadas ao efluente pesqueiro.....	62
8.6.	Genotoxicidade do efluente pesqueiro.....	63
8.7.	Atividade catalase, carboxilesterase e glutationa-S-transferase.....	65
9.	Conclusão .....	67
10.	Referências Bibliográficas .....	68
11.	Anexo .....	81

11.1.	Documento de aprovação da comissão de ética no uso de animais .....	81
12.	Apêndice .....	82
12.1.	Tabela de padrões etológicos reacionais .....	82
12.2.	Método para cultivo de larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	83
12.3.	Método para cultivo de náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	86
12.4.	Coloração pelo método de MOWRY (1958, Modificado) de ferro coloidal para mucopolissacarídeos (Azul da Prússia) .....	89
12.5.	Coloração pelo método de PERLS para cobre .....	92
12.6.	Ensaio Cometa - <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> (SCGE) .....	94

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Soluções salinas empregadas para o preparo da água de manutenção de espécimes de *P. reticulata* segundo normatização n° 203 (OECD, 1992)..... 27
- Tabela 2.** Critérios para a realização de bioensaios com peixes definidos pelo Guia para Testes Químicos (n° 203) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD)..... 28
- Tabela 3.** Valores da aferição de parâmetros físico-químicos, inorgânicos, orgânicos, realizados no pesqueiro do lago artificial do Jaó em período de seca e chuva de 2014..... 36
- Tabela 4.** Espécies de algas planctônicas dos filos Cyanobacteria, Chlorophyta, Cryptophyta, Carophyta e Bacillariophyta identificadas no lago artificial do Clube de Pesca Jaó ..... 37
- Tabela 5.** Toxicidade aguda (96h) do  $\text{Cu}^{2+}$  determinada pela concentração letal (CL) em machos e fêmeas de guppies (*Poecilia reticulata*)..... 40
- Tabela 6.** Toxicidade aguda (96h) do efluente pesqueiro, no período de seca e de chuva, determinada pela concentração efetiva (CE) causadora de disfunções etológicas em machos e fêmeas de guppies (*Poecilia reticulata*)..... 41

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da disposição e dos efeitos tóxicos de agentes químicos (KLAASSEN & WATKINS III, 2012) ..... 5
- Figura 2.** Origem dos *blooms* de cianobactérias tóxicas e possíveis vias de exposição humana. \*80% da exposição humana a cianotoxinas (MEREL & WALKER et al., 2013) ..... 6
- Figura 3.** Estrutura química das principais cianotoxinas encontradas em *blooms* de cianobactérias em ambientes eutrofizados (De acordo com: MEREL et al., 2013) ..... 11
- Figura 4.** Efeito do período de seca e de chuva, da descarga e escoamento de contaminantes urbanos, do aumento da variabilidade hidrológica e das alterações nas condições físico-químicas e bióticas que modulam a composição fitoplanctônica nos ecossistemas aquáticos (PAERL et al., 2016). Sob as fortes condições pluviométricas do período chuvoso (à esquerda), ocorrerá um aumento na concentração de nutrientes, devido ao lixiviamento e com isso maiores taxas de crescimento das algas aumentando a biomassa fitoplanctônica. Em condições de seca, com águas que não fluem continuamente (à direita), o lixiviamento de nutrientes diminuirá, entretanto, a ausência de movimentação das águas, devido à pouca ação dos ventos, promove um período de estratificação vertical que permite que as cianobactérias flutuantes dominem a superfície do corpo hídrico ..... 13
- Figura 5.** Dimorfismo sexual entre espécimes de *Poecilia reticulata*. (A) Espécime macho de *P. reticulata* com ocelos negros em regiões de coloração alaranjada nos flancos, no pedúnculo caudal e nas nadadeiras. (B) Espécime fêmea de *P. reticulata* caracterizada pela presença de flancos e dorso na coloração castanho claro uniforme, apresentando o pedúnculo caudal, nadadeira dorsal e anal com aspecto hialino..... 18
- Figura 6.** Aspectos gerais do lago artificial do Clube de Pesca Jaó e seus efluentes. (A) Clube de Pesca Jaó (B) adensamento de algas e cianobactérias na lâmina superficial do pesqueiro (C) Rio Meia Ponte sendo corpo receptor do efluente do pesqueiro; (D) corpo hídrico apresentando coloração esverdeada intensa devido ao acúmulo de algas e cianobactérias; (E) antiga barragem da usina hidrelétrica Jaó; (F) grande biomassa fitoplanctônica no curso de despejo no Rio Meia Ponte..... 21

**Figura 7.** Representação esquemática das análises físicas, químicas e biológicas realizadas no lago artificial do Clube de Pesca Jaó e dos ensaios de toxicidade (histológicos, enzimáticos, comportamentais, de mortalidade e de genotoxicidade) realizados nos espécimes de *P. reticulata* expostos às amostras de água desse lago ..... 23

**Figura 8.** Fotomicrografias de epifluorescência de cometas e nucleóides obtidos a partir de eritrócitos de machos e fêmeas de *P. reticulata*. O ânodo é disposto à direita das fotomicrografias. De (A) até (B) é representada uma escala gradual do dano genômico observado nos eritrócitos após a realização do ensaio cometa..... 32

**Figura 9.** Densidade populacional de diferentes táxons de algas coletadas no lago artificial pesqueiro Jaó..... 39

**Figura 10.** Principais gêneros produtores de microcistina encontrados em amostras de fitoplâncton coletadas no lago artificial pesqueiro do Jaó. (A) a seta preta indica uma colônia irregular de *Microcystis* sp evidenciando mucilagem conspícua envolvendo a colônia. (B) filamento simples de *Anabaena* sp caracterizado pela presença de heterócito (seta) e acineto (cabeça de seta) ao longo do filamento..... 39

**Figura 11.** Fotomicrografias de tecido hepático de *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$  (Coloração pelo método de Perls para cobre, com modificações). Imagens à esquerda correspondem ao fígado de machos e a direita de fêmeas. (A) e (B) grupo controle sem deposição de  $Cu^{2+}$ ; (C) e (D) grupo tratado com  $Cu^{2+}$  mostra intensa deposição de íons cúpricos no citoplasma dos hepatócitos, sendo as fêmeas caracterizadas pelo maior acúmulo desses íons; (E) e (F) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de seca apresentando pouca deposição de  $Cu^{2+}$  nos hepatócitos, tanto nos espécimes machos quanto nas fêmeas; (G) e (H) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de chuva apresenta maior deposição de cobre nos hepatócitos, em relação à seca, sendo esse aspecto caracterizado pela coloração avermelhada dessas células em todo o tecido hepático..... 43

**Figura 12.** Fotomicrografias de perfis histopatológicos na porção medial do intestinal delgado de *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$  (Coloração pelo método de Ferro Coloidal). (A) grupo controle mostra citoarquitetura e disposição normal das vilosidades (corte transversal); (B) grupo tratado com  $Cu^{2+}$  apresenta vilosidades com deposição de mucina, células caliciformes com maior área e em grande número (setas pretas) (corte transversal). (C) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de seca e (D) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de chuva, ambos, apresentam intestino com numerosas células califormes em processo de lise para deposição de mucina, assim como maior diâmetro das vilosidades e maior área das células caliciformes (corte transversal); (E) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de chuva apresenta seções intestinais distintas com número variável de células calificormes e deposição de mucina na luz intestinal e centros de melanomacrófagos (setas pretas) (corte longitudinal). mm: muscular mucosa; pl: lâmina própria; cp: cripta; ep: epitélio; lm: lúmen; v: vilosidade.....45

**Figura 13.** Morfometria intestinal de machos e fêmeas de *P. reticulata* sob exposição aguda ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e chuva (2014) e à  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . (A) Área das células caliciformes como parâmetro morfométrico da porção medial do intestino delgado. (B) Diâmetro das vilosidades intestinais como parâmetro morfométrico da porção medial do intestino delgado. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e controles ( $p < 0,05$ )..... 47

**Figura 14.** Porcentagem de DNA na cauda do cometa como parâmetro de dano genômico mensurado em *P. reticulata* sob exposição aguda ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e controles ( $p < 0,05$ ). Porcentagem de DNA da cauda do cometa com base na média de 50 nucleóides analisados por espécime ( $n=5$ ) em cada tratamento. Ciclofosfamida ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo..... 48

**Figura 15.** Fotomicrografias de epifluorescência de cometas e nucleóides obtidos a partir de eritrócitos de machos e fêmeas de *P. reticulata* mantidos sob exposição aguda ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . O ânodo é disposto à direita das fotomicrografias. Nucleóides sem dano observados no grupo controle (A); Migração do DNA após exposição dos eritrócitos à  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$  (B); Nucleóides com pouco dano genômico obtidos

a partir dos espécimes expostos ao efluente pesqueiro no período de seca (C). Grande extensão de dano genômico após exposição ao efluente pesqueiro coletado no período de chuva (D)..... 49

**Figura 16.** Em A são apresentados os dados cinéticos ( $K_M$  e  $V_{MAX}$ ) e em B são representados os dados da variação de pH da padronização da atividade da catalase em guppies (*Poecilia reticulata*). Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo os ensaios enzimáticos realizados em triplicata a partir de *pools* de três fígados..... 50

**Figura 17.** Catalase como parâmetro de estresse oxidativo em *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . Os dados são apresentados como média e erro padrão da média da atividade da catalase (CAT) em *pools* (n=3) de fígado de *P. reticulata*. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratado e controle de cada período de exposição separadamente..... 51

**Figura 18.** Em A são apresentados os dados cinéticos ( $K_M$  e  $V_{MAX}$ ) e em B são representados os dados da variação de pH da padronização da atividade da carboxilesterase em guppies (*Poecilia reticulata*). Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo os ensaios enzimáticos realizados em triplicata a partir de *pools* de três fígados..... 52

**Figura 19.** Carboxilesterase como parâmetro de biotransformação em *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . Os dados são apresentados como média e erro padrão da média da atividade da carboxilesterase (CarbE) em *pools* (n=3) de fígado de *P. reticulata*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os grupos tratado e controle de cada período de exposição separadamente..... 52

**Figura 20.** Na figura A são apresentados dos dados cinéticos ( $K_M$  e  $V_{MAX}$ ) da atividade da carboxilesterase referentes ao substrato CDNB, e na figura B são apresentados dos dados cinéticos da atividade da carboxilesterase referentes ao substrato GSH. Na figura C é representada a variação do pH realizada para a padronização da atividade da carboxilesterase. Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo as padronizações realizadas em triplicata a partir de *pools* compostos por três fígados ..... 53

**Figura 21.** Glutathione-S-transferase como parâmetro de biotransformação em *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a CL<sub>50</sub> do Cu<sup>2+</sup>. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média da atividade da glutathione-S-transferase (GST) em pools (n=3) de fígado de *P. reticulata*. Letras iguais indicam não haver diferença significativa (p>0,05) entre os grupos tratado e controle de cada período de exposição separadamente..... 54

**Figura 22.** Cultivo de larvas e moscas de *Drosophila melanogaster*. (A) frasco de cultivo de moscas contendo meio banana-ágar, larvas em diferentes estágios e pupas aderidas a parede do vidro (B) terceiro estágio larval; (C) fase de pupa; (D) a esquerda uma mosca adulta macho e a direita uma mosca adulta fêmea..... 80

**Figura 23.** Cistos e náuplios de *Artemia salina* obtidos em diferentes fases de cultivo. (A) Solução de eclosão contendo cistos hidratados na fase superior e náuplios recém eclodidos na fase inferior; (B) cistos não hidratados caracterizados morfologicamente por possuírem superfície côncava; (C) Processo de descapsulação dos cistos evidenciado pelo rompimento do córion; (D) náuplio de *Artemia salina* caracterizado morfologicamente pela presença de três apêndices corporais..... 84

## LISTA DE SÍMBOLOS

- > - Maior que
- < - Menor que
- ± - Mais ou Menos
- % - Porcentagem
- $\alpha$  – Alfa
- °C - Graus Celsius
- ‘ - Minutos
- “ - Segundos
- $\Sigma$  - Somatório
- ® - Marca Registrada
- $\mu\text{g}$  - Micrograma
- 2n - Diplóide
- cm - Centímetro
- Da - Dalton
- DH - Grau Alemão
- g - Grama
- h - Horas
- i.p. - Intraperitoneal
- kb - Kilobase
- kg - Kilograma
- mg - Miligramas
- mL - Mililitro
- mS - Milisiemens
- mV - Milivolts
- N° - Número
- p - probabilidade
- pH - Potencial Hidrogênio Iônico
- sp. - Espécie
- spp. - Espécies
- x - vezes

## LISTA DE SIGLAS

**2,4-D** – Ácido 2,4-diclorofenóxiacético

**ADDA** – Ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-dienóico

**ANOVA** – Análise de Variância

**APx** – Ascorbato Peroxidase

**ARG** – Arginina

**CAT** – Catalase

**CE<sub>50</sub>** – Concentração Efetiva Média

**CL<sub>10</sub>** – Concentração Letal para 10%

**CL<sub>50</sub>** – Concentração Letal Média

**CL<sub>90</sub>** – Concentração Letal para 90%

**CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente

**CP** – Controle Positivo

**D-GLU** – Ácido Glutâmico

**DHAR** – Dehidroascorbato Redutase

**D-METIL-ASP** – Ácido D-eritro-beta-metil-aspártico

**DMT** ou **NRAMP** – Família de Proteínas Transportadoras de Metais Bivalentes

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**Fc** – Fator de Contagem

**GC** – Grupo Controle

**GO** – Goiás

**GPx** – Glutathione Peroxidase

**GR** – Glutathione Redutase

**GSH-Px** – Glutathione Peroxidase

**GSH** – Glutathione Reduzida

**GSSG** – Glutathione Oxidada

**GST** – Glutathione-S-Transferase

**h** – altura

**HC** – Hospital das Clínicas

**HPAs** – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas

**IM** – Índice Mitótico

**IPCS** – Programa Internacional de Segurança Química

**LAMARH** – Laboratório de Análise e Gerenciamento Ambiental de Recursos Hídricos

**LOEC** – Mínima Concentração de Efeito Observado

**MCYSTs** – Microcistinas

**MCYST-GSH** – Conjugado Glutathiona-Microcistina

**MCYST-LA** – Microcistina Leucina-Alanina

**MCYST-LR** – Microcistina Leucina-Arginina

**MCYST-RR** – Microcistina Arginina-Arginina

**MCYST-YR** – Microcistina Tirosina -Arginina

**MDHA** – N-metil-desidro-alanina

**MDHAR** – Monodehidroascorbato Redutase

**nc** – Número de Campos Aleatórios Contados

**NMHCs** – Hidrocarbonetos Não Metano

**NRPS** – Complexo Multienzimático Não-ribossomal Peptídeo Sintase

**NTU** – Unidade Nefelométrica de Turbidez

**OATPs** – Polipeptídios Transportadores de Ânions Orgânicos

**OD** – Oxigênio Dissolvido

**OECD** – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ONU** – Organização das Nações Unidas

**ORFS** – Sequência de Leitura Aberta

**PE** – Pernambuco

**PKSs** – Complexo Multienzimático Policetônico Sintase

**PP-1** – Fosfatase 1

**PP-2A** – Fosfatase 2A

**sc** – Área do Campo de Análise

**SH** – Grupamento Sulfidril

**SOD** – Superóxido Dismutase

**STD** – Sólidos Totais Dissolvidos

**Tic** – Total de Indivíduos Contados

**UFG** – Universidade Federal de Goiás

**Vtc** – Volume Total Contado

**ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO EM MACHOS E FÊMEAS DE *Poecilia reticulata*  
EXPOSTOS A UM EFLUENTE PESQUEIRO DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA  
(GO)**

**RESUMO**

**AUTOR: RAFAEL COSME MACHADO**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-MORAIS**

**Palavras-chave:** Contaminação antrópica, *guppy*, ecotoxicologia, *endpoints* e sazonalidade

**E-mail:** rafaelcosmegyn@hotmail.com; simonesaboias@gmail.com

A toxicidade de contaminantes ambientais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais pesados e cianotoxinas tem sido frequentemente investigada quanto aos seus aspectos bioquímicos, celulares e patológicos sobre animais e seres humanos. Dentre os metais pesados, o cobre é um elemento químico que em concentrações traço, é comumente encontrado em lagos naturais e artificiais. O aumento na concentração desse metal em pesqueiros, devido ao uso de algicidas, como o  $\text{CuSO}_4$ , ou pela lixiviação do solo, é responsável pela intoxicação dos organismos aquáticos, particularmente os peixes, que por consequência representam um risco potencial para a saúde humana. Esse estudo teve por objetivo determinar a composição fitoplanctônica, as características físico-químicas e os principais contaminantes orgânicos e inorgânicos dos corpos hídricos, além de avaliar a toxicidade aguda do efluente bruto do pesqueiro Jaó utilizando *endpoints* histológicos, etológicos, genotóxicos e enzimáticos em *Poecilia reticulata*. Foram encontradas concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$ , fósforo e nitrogênio acima do permitido pelas resoluções nº 357 e 430 do CONAMA, elementos que, em sinergia com demais contaminantes químicos em mistura, causaram toxicidade aguda para *P. reticulata* expostos no período de seca ( $\text{CE}_{50-96\text{h}}$  de 60,48% para machos e de 85,08% para fêmeas) e de chuva ( $\text{CE}_{50-96\text{h}}$  de 32,29% para machos e de 49,50% para fêmeas). Este estudo demonstrou que o cobre possui acentuada deposição sobre o parênquima hepático de machos e fêmeas de *P. reticulata*. Em análise da porção medial do intestino delgado, foi observado que o aumento na produção de mucina é uma resposta fisiológica ao estresse causado pelo cobre, quantificado no efluente pesqueiro, de modo que esses mesmos resultados foram observados quando os espécimes foram expostos a concentração letal média de 96 horas ( $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ) do  $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,82 \pm 0,17 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ ). Também foi observado o efeito genotóxico do efluente do período de seca e de chuva sobre os eritrócitos de *P. reticulata* de modo que as fêmeas apresentaram maior sensibilidade ( $p < 0,05$ ) a contaminação pelo cobre. Em ensaio enzimático a atividade da carboxilesterase (CarbE) foi reduzida ( $p < 0,05$ ) em fêmeas expostas ao efluente do período chuvoso não sendo observadas alterações na atividade da catalase (CAT) e da glutathione-S-transferase (GST). Medidas mitigadoras devem ser tomadas para que se reduza a contaminação por cobre e macronutrientes no pesqueiro estudado, evitando assim os riscos potenciais à comunidade aquática e pesqueira.

**ECOTOXICOLOGICAL STUDY IN MALES AND FEMALES OF *Poecilia reticulata* EXPOSED TO A FISHING EFFLUENT IN THE CITY OF GOIÂNIA (GO)**

**ABSTRACT**

**AUTHOR: RAFAEL COSME MACHADO**

**DISSERTATION ADVISOR: DRA. SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-MORAIS**

**Keyword:** Humans contamination, *guppy*, ecotoxicology, *endpoints*, Seasonality

**E-mail:** rafaelcosmegyn@hotmail.com; simonesaboias@gmail.com

The toxicity of environmental contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heavy metals and cyanotoxins has frequently been investigated for its biochemical, cellular and pathological aspects on animals and humans. Among heavy metals, copper is a chemical element that in trace concentrations is commonly found in natural and artificial lakes. The increase in the concentration of this metal in fishing ponds due to the use of algicides, such as  $\text{CuSO}_4$ , or by leaching of the soil, is responsible for the intoxication of aquatic organisms, particularly fish, therefore representing a potential risk to human health. The aim of this study was to determine the phytoplanktonic composition, physicochemical characteristics and the main organic and inorganic contaminants of the water bodies, as well as to evaluate the acute toxicity of the crude effluent from the Jaó fishing pond using histological, ethological, genotoxic and enzymatic endpoints in *Poecilia reticulata*. Concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$ , phosphorus and nitrogen were higher than allowed by CONAMA resolutions 357 and 430, which, in synergy with other chemical contaminants in the mixture, caused acute toxicity to *P. reticulata* exposed during the dry season (EC50-96h of 60.48% for males and 85.08% for females) and for rainy (EC50-96h of 32.29% for males and of 49.50% for females). This study demonstrated that copper has a pronounced deposition on the hepatic parenchyma of males and females of *P. reticulata*. In the analysis of the medial portion of the small intestine, it was observed that the increase in mucin production is a physiological response to stress induced by copper, quantified in the fishing effluent, so that the same results were observed when the specimens were exposed to the average lethal concentration of 96 hours (CL<sub>50-96h</sub>) to  $\text{Cu}^{2+}$  ( $0.82 \pm 0.17 \text{ mg.L}^{-1}$  of  $\text{CuSO}_4$ ). It was also observed the genotoxic effect of the effluent from the dry and rainy season on the *P. reticulata* erythrocytes, so that the females had a higher sensitivity ( $p < 0.05$ ) to the copper contamination. In enzymatic assays, the activity of carboxylesterase (CarbE) was reduced ( $p < 0.05$ ) in females exposed to the rainy season effluent and no changes in the activity of catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) were observed. Mitigating measures should be taken to reduce contamination by copper and macronutrients in the fishing pond studied, thus avoiding potential risks to the aquatic and human communities

## 1. Introdução

O constante despejo de poluentes químicos no meio ambiente tem afetado o equilíbrio dos ecossistemas naturais e, conseqüentemente, tem chamado a atenção de vários pesquisadores e órgãos governamentais para o estado de saúde dos organismos aquáticos (LEME & MARIN-MORALES, 2009). No geral, o despejo ambiental de efluentes, quando não adequadamente tratado, pode levar à deterioração da qualidade da água, sendo essa considerada uma das principais causas da poluição de corpos receptores como os rios (MACEDA-VEIGA; MONROY; DE SOSTOA, 2012).

Os poluentes químicos têm se tornado uma crescente ameaça ao ambiente aquático, sendo os seres humanos e os ecossistemas expostos a uma mistura altamente variável e desconhecida de compostos. Embora os produtos químicos, geralmente, sejam presentes em baixas concentrações nos rios e lagos, eles podem interagir entre si, resultando em efeitos toxicológicos aditivos ou sinérgicos (GOUJON et al., 2014).

As águas superficiais, como os rios e lagos, de muitas bacias hidrográficas são alvos recorrentes do acúmulo de misturas contaminantes devido à lixiviação de resíduos urbanos, agrícolas e domésticos (MAZZEO et al., 2015). As interações biológicas destas misturas orgânicas e inorgânicas representam uma questão ecológica importante na compreensão da toxicidade de xenobióticos e metais pesados nos corpos hídricos, entretanto, as interações entre as misturas e os mecanismos de sinergia são de difícil compreensão (TILTON et al., 2011).

Assim, fatores ambientais abióticos como a temperatura, pH e o oxigênio dissolvido bem como alguns fatores bióticos como presença de agentes patogênicos e toxinas naturais, como as de alguns gêneros de cianobactérias, podem contribuir para o aumento da toxicidade de poluentes aquáticos (AUGUSTYNIAK et al., 2014).

Diversos compostos xenobióticos podem ser comumente encontrados em águas eutrofizadas, principalmente nas de sistemas de aquicultura que contém descargas de resíduos industriais ou domésticos, de modo que pouca atenção tem sido dada às interações entre contaminantes orgânicos, inorgânicos e suas variações sazonais (TAO et al., 2013).

Nesse contexto, o crescimento populacional e o aumento na demanda mundial por alimentos de origem aquática, como os peixes, resultaram em uma expansão nos sistemas de aquicultura, entretanto, juntamente com esse crescimento também se tornaram maiores os casos de contaminação por compostos xenobióticos em corpos hídricos (CORRÊA & PENAFORT, 2011).

Devido à poluição e consequente eutrofização de corpos hídricos como os pesqueiros, os episódios de florações de cianobactérias tóxicas têm sido descritos, sempre associados a problemas de saúde humana e envenenamento de animais, devido ao aumento desses organismos ao longo dos últimos anos (GARCÍA-VILLADA et al., 2004).

Dentre alguns táxons de cianobactérias, os gêneros *Anabaena* sp., *Microcystis* sp e *Planktothrix* sp. são descritos como produtores de cianotoxinas, sendo táxons de ocorrência mundial que, dependendo do estado trófico de um corpo hídrico, podem atingir altas densidades populacionais formando grandes biomassas fitoplanctônicas denominadas de *blooms* (SILVA et al., 2013).

Em ambientes impactados, os seres humanos estão frequentemente expostos a poluentes orgânicos, metais pesados e toxinas por diferentes vias, incluindo pelo consumo de água ou produtos alimentares contaminados e pelo contato recreativo. Assim, a contaminação das águas superficiais pode causar problemas de qualidade da água para a aquicultura, além de ser um fator de risco para a saúde do ser humano e dos animais. (CORBEL; MOUGIN; BOUAÏCHA, 2014).

Estudos com cianotoxinas somente passaram a ter destaque após a morte de 52 pacientes por contaminação com microcistinas ocorrida em uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru-PE (AZEVEDO et al., 2002), onde foram definidas concentrações máximas desta cianotoxina em corpos hídricos pela Portaria n° 514 do Ministério da Saúde e pela Resolução n° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), sendo este considerado como o marco inicial do monitoramento de cianotoxinas em corpos hídricos continentais brasileiros.

Dentre as ferramentas empregadas para o estudo de lagos e rios impactados, no Brasil, várias espécies de peixes, como *Poecilia reticulata*, têm sido utilizadas para se avaliar a toxicidade ambiental de compostos químicos como as cianotoxinas, o cobre (MACHADO et al., 2013) e efluentes líquidos, sejam eles industriais (LARSSON et al., 2002), pluviais urbanos (MACEDA-VEIGA; MONROY; DE SOSTOA, 2012), agrícolas ou domésticos (BERTOLETTI, 2009).

Nesse contexto, este estudo buscou monitorar as populações de cianobactérias e quantificar poluentes ambientais como cianotoxinas, metais pesados, HPAs, pesticidas e herbicidas em um lago artificial pesqueiro da cidade de Goiânia-GO, investigando os efeitos da toxicidade aguda dessas águas sobre o guarú (*P. reticulata*) por meio da avaliação de *endpoints* comportamentais, histológicos, genotóxicos e enzimáticos. Com isso, busca-se gerar informações sobre a estrutura das populações de cianobactérias além de caracterizar esse corpo hídrico quanto

aos principais poluentes orgânicos e inorgânicos oriundos do aumento nas atividades antrópicas dessa região.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Recursos Hídricos**

Grande parte da superfície do planeta Terra (cerca de 75%) é coberta com água, seja ela no estado sólido, líquido ou gasoso, entretanto, desse total apenas 5% é de água doce. A maior parte da água doce é encontrada sob a forma de geleiras nos polos norte e sul, sendo uma menor quantidade correspondente águas subterrâneas, e apenas 0,01% distribuída entre rios e lagos (ODLARE, 2014).

Devido ao crescimento populacional e consequente desenvolvimento econômico, a demanda de água para consumo urbano, industrial e agrícola tem aumentado na última década. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o racionamento de água é uma questão crítica em muitos países e cerca de 2 bilhões de pessoas estarão vivendo em regiões com escassez de água até 2025 (WANG & HUANG, 2014).

A poluição da água é hoje um dos grandes problemas mundiais que é discutido no âmbito de saúde pública, sendo necessária a avaliação e caracterização dos potenciais contaminantes, seja de origem orgânica ou inorgânica, levando em consideração as flutuações populacionais nas comunidades aquáticas e a sazonalidade (TRAN et al., 2014).

Antes do século XIX a qualidade da água era associada apenas aos parâmetros como cor, sabor, odor e principalmente quanto aos veículos de transmissão de doenças sendo estes os aspectos que justificavam a necessidade do seu tratamento e monitoramento de qualidade (SANCHES et al., 2012).

Ao lidar com as características ambientais, a determinação, exata, de parâmetros físicos, químicos e biológicos é difícil devido à grande variabilidade que caracteriza os sistemas naturais. Assim, a sazonalidade pode ser vista de maneira cíclica, o que torna os resultados da detecção dos parâmetros dependentes da escala temporal, seja ela mensal, semestral ou anual (ANGHILERI; PIANOSI; SONCINI-SESSA, 2014).

Os ecossistemas aquáticos devem ser monitorados para se obter conhecimento das alterações na composição biótica e abiótica que ocorrem em detrimento das ações antrópicas, assim, políticas e estratégias integradas precisam ser implementadas para se minimizar os problemas de conservação desses ambientes. O cenário do monitoramento hídrico, principalmente nas regiões dos grandes centros urbanos, é caracterizado pela crescente ocorrência de poluentes

emergentes como agrotóxicos (HARAYASHIKI et al., 2013) e hormônios (YAN et al., 2014) e pela deficiência da legislação nacional que regulamenta a qualidade e vigilância da água (HESPANHOL, 2013).

## **2.2. Ecotoxicologia**

A ecotoxicologia é uma ciência moderna que estuda os efeitos adversos das substâncias químicas sobre os ecossistemas e a biodiversidade, sendo intrinsecamente relacionada com a ecologia e a toxicologia tanto em seu aspecto conceitual quanto metodológico (TARAZONA, 2014). Se divide em três grandes áreas, a ecotoxicologia terrestre, aérea e aquática, sendo a última a mais antiga e reconhecida historicamente devido ao fato dos ecossistemas aquáticos serem os principais corpos receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos hídricos por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou lixiviados a partir de solos contaminados (COSTA et al., 2008).

A maioria dos estudos realizados em ecotoxicologia ocorrem a nível individual e com um único agente estressor, entretanto, em condições ambientais o estresse múltiplo é recorrente devido a variação de características abióticas, competição intra e interespecífica, dentre as outras características que tornam complexas as análises e descrições dos fatores ambientais (JAGER et al., 2014).

Vários testes para avaliação ecotoxicológica são disponíveis para estudos ambientais e, em conjunto, são capazes de descrever diferentes mecanismos de ação de substâncias tóxicas, tornando-se excelentes ferramentas no diagnóstico e prognóstico de alterações nos ecossistemas, entretanto, nesse tipo de estudo deve ser dada a devida atenção a extrapolação dos resultados dos testes experimentais para o ambiente (SCHMITT-JANSEN et al., 2008).

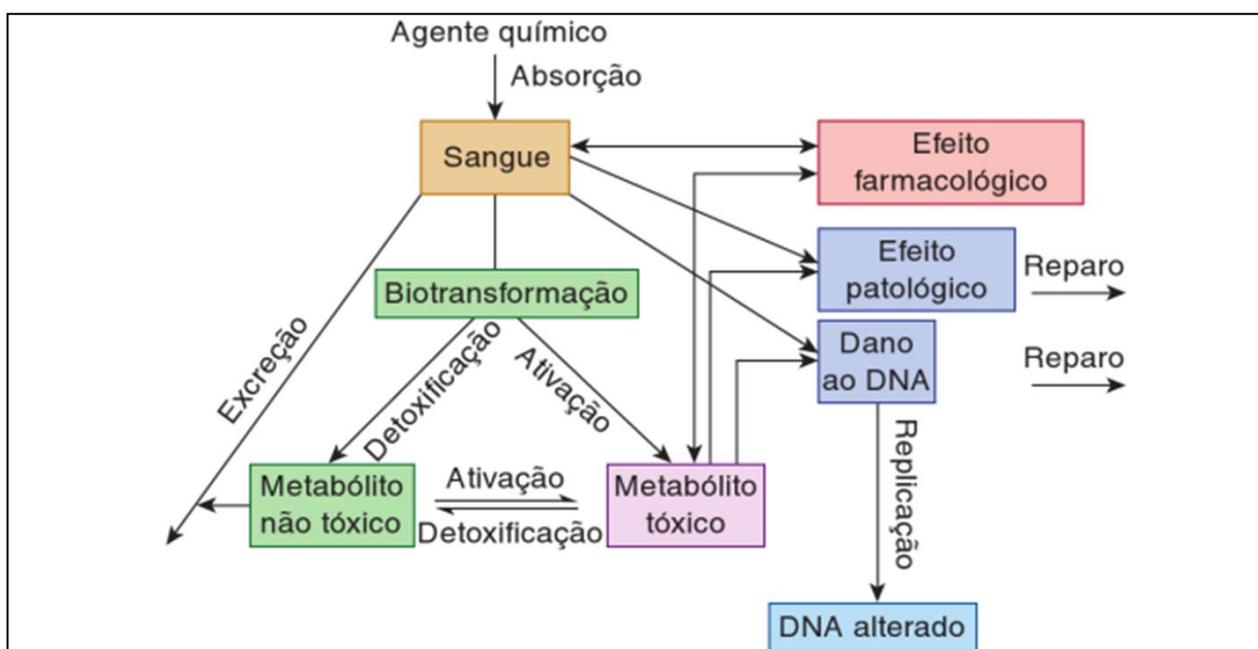
Dentre os estudos realizados em ecotoxicologia, destacam-se os que se destinam a análise de cargas excessivas de nutrientes (N e P), tendo em vista que a ampla disponibilidade de nutrientes é uma condição necessária para o estabelecimento e consolidação de densas biomassas de algas em corpos hídricos o que acaba por reduzir a luminosidade e consequente taxa fotossintética na coluna de água desencadeando a mortandade de peixes e outros organismos aquáticos (LÜRLING & OOSTERHOUT, 2013).

A detecção e caracterização de resíduos químicos em um ambiente torna-se importante quando se busca conhecer se o resíduo promove algum um efeito toxicológico significativo sobre o meio ambiente. Assim, os bioensaios ecotoxicológicos tornam-se cada vez mais importantes nos estudos de ambientes terrestres e aquáticos sob ação antrópica, pois possibilitam detectar

alterações biológicas por meio dos efeitos agudos ou crônicos de substâncias nos organismos (ARAÚJO et al., 2006).

Essas alterações biológicas, desencadeadas pela contaminação por poluentes urbanos, podem ser reconhecidas por meio da análise de parâmetros genéticos, enzimáticos, celulares e histológicos em órgãos de animais contaminados (SANTOS et al., 2016).

Muitos agentes químicos não são tóxicos ou apresentam baixa toxicidade, entretanto, quando ativados por biotransformação podem tornar-se metabólitos tóxicos. De forma alternativa, um toxicante muito potente pode ser detoxificado rapidamente por biotransformação (Figura 1). Efeitos tóxicos estão relacionados à concentração desses metabólitos no órgão-alvo. Assim, a resposta tóxica exercida pelos agentes é consideravelmente influenciada por taxas de absorção, distribuição, biotransformação e excreção (KLAASSEN & WATKINS III, 2012).



**Figura 1.** Representação esquemática da disposição e dos efeitos tóxicos de agentes químicos (KLAASSEN & WATKINS III, 2012).

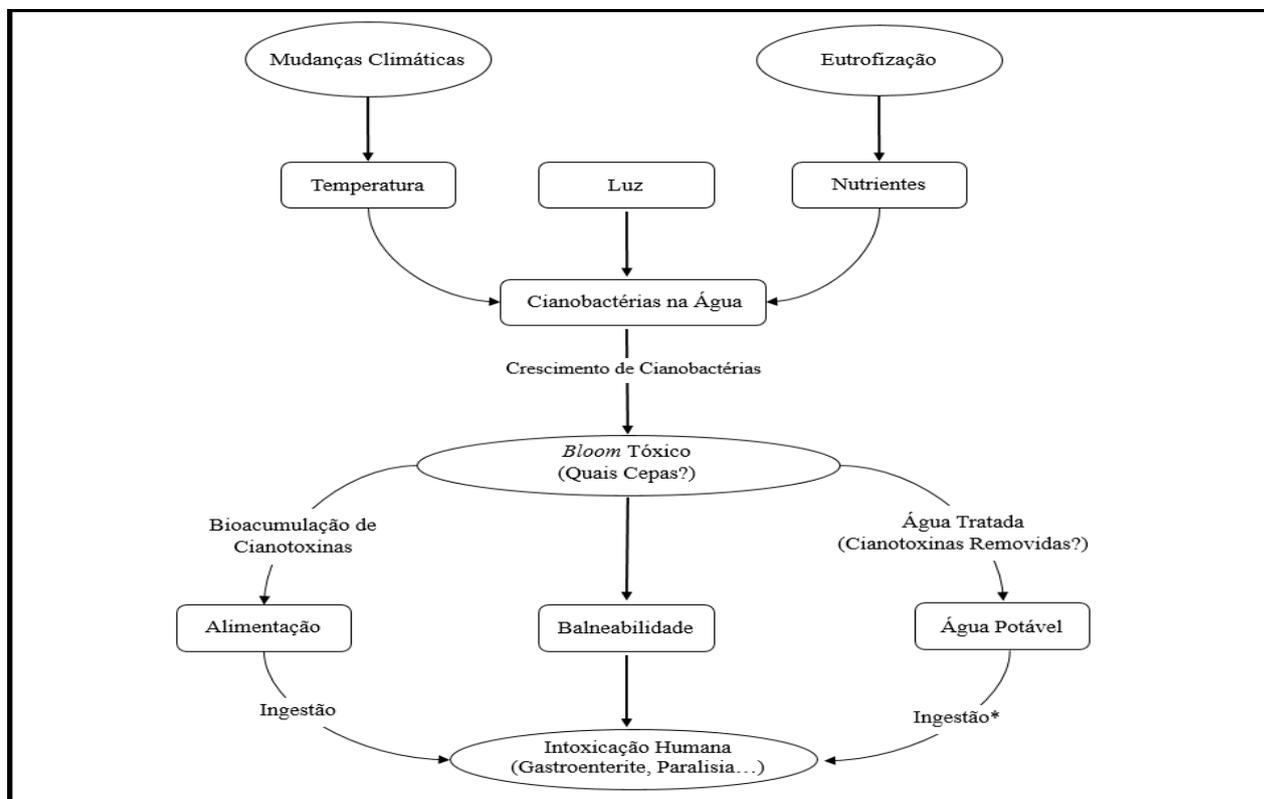
### 2.3. Eutrofização

O acúmulo de matéria orgânica em rios, lagos ou represas pode desencadear o início do processo de eutrofização por meio da deterioração da qualidade das águas superficiais, seja devido a ação do próprio contaminante orgânico ou pela formação de subprodutos prejudiciais (ZHANG et al., 2014). Assim, ambientes aquáticos altamente suscetíveis a contaminantes, como os pesqueiros ou corpos receptores de efluentes, possuem baixa capacidade de se recuperar e voltar ao seu estado original, ou seja, baixa resiliência (GÓMEZ et al., 2014).

A eutrofização é um processo natural de enriquecimento de corpos hídricos por acúmulo de nutrientes, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados, que são essenciais na proliferação e crescimento da biomassa fitoplanctônica, formando assim uma densa camada de algas denominada de floração ou *bloom* (NDONG et al., 2014).

O estabelecimento de uma floração conduz, entre outros efeitos, a perda de transparência, redução da quantidade de oxigênio dissolvido, elevada concentração de clorofila-a e a presença de odor e sabor nas águas. Sabe-se que em condições naturais os corpos hídricos podem levar até milhares de anos para tornarem-se eutróficos, entretanto, justifica-se o aumento de ocorrências de *blooms* devido à presença de atividade antrópica nesses ambientes (KHAN & ANSARI, 2005).

Em um *bloom*, apenas algumas espécies dominam a comunidade do fitoplâncton, sendo estas algas geralmente pertencentes a divisão Cyanophyta. Dentre estas, algumas espécies são frequentemente relatadas devido a sua ampla ocorrência e toxicidade (Figura 2), como por exemplo *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena spiroides* e espécies do gênero *Planktothrix* (PEREIRA, 2004). Vários fatores abióticos tais como a temperatura, luz, disponibilidade de nutrientes, e turbulência induzida pelo vento, podem desempenhar um papel importante na formação de grandes biomassas fitoplanctônicas de cianobactérias (GENG; QIN; YANG, 2013).



**Figura 2.** Origem dos *blooms* de cianobactérias tóxicas e possíveis vias de exposição humana.

\*80% da exposição humana a cianotoxinas (MEREL & WALKER et al., 2013).

O crescimento excessivo de algas em reservatórios brasileiros é uma realidade que tem prejudicado esses corpos hídricos, sejam eles para fins de abastecimento, balneabilidade, agricultura ou atividades pesqueiras. Algumas espécies de cianobactérias podem causar gosto e odor desagradáveis na água, entretanto, o maior problema está no fato de que alguns desses táxons podem produzir cianotoxinas que, dependendo da sua concentração nas águas e tipo de exposição, podem causar a morte de animais domésticos e selvagens e também promover a intoxicação humana pela ingestão de águas ou alimentos contaminados (SANCHES et al., 2012).

Portanto, gestores de recursos hídricos e toxicologistas aquáticos devem utilizar de tratamentos eficazes para mitigar os processos de eutrofização, sendo que a primeira etapa necessária é o controle da eutrofização por meio do combate a entrada direta de poluentes orgânicos, seguindo com o seu isolamento dos corpos receptores, contribuindo assim para o não agravamento da qualidade da água (LÜRLING & OOSTERHOUT, 2013).

#### **2.4. Efluentes Aquáticos**

Na maioria dos grandes centros urbanos, a eliminação de elevadas quantidades de resíduos domésticos, químicos e industriais em diferentes corpos hídricos tem efeitos negativos sobre os habitats aquáticos, desencadeando modificações nos padrões de reprodução e sobrevivência da fauna e flora local. Assim, rios e lagos são frequentemente usados como corpos receptores de resíduos provenientes de grandes regiões metropolitanas e municípios que apresentam atividades agrícolas (MONTAG et al., 2011).

Quando não se conhece a composição de misturas complexas com potencial toxicológico, o emprego de biomonitoradores torna-se importante para se avaliar uma possível fonte de contaminação. Na análise do efeito de efluentes aquáticos sobre um ecossistema, biomonitoradores animais e vegetais são muito utilizados, pois, quando comparados com as análises de resíduos químicos, esses organismos possuem a vantagem de possibilitar inferências biológicas relevantes. Assim, quando expostos, além de apresentarem respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas a diferentes grupos de contaminantes químicos, os biomonitoradores aquáticos também determinam os efeitos da exposição ao efluente tóxico sobre a saúde e sobrevivência das populações expostas (RIFFAT & AHMAD, 2005).

No Brasil, o despejo de efluentes em um corpo receptor deve estar de acordo com os critérios de ecotoxicidade previstos na Resolução nº 430 do CONAMA, de modo que os resultados devem se basear em ensaios ecotoxicológicos com validação nacional ou internacional,

utilizando organismos de dois níveis tróficos distintos. Para isso, a resolução exige a realização de uma estimativa da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) ou concentração efetiva mediana (CE<sub>50</sub>) que é a concentração do efluente aquático que causa efeito agudo a 50% dos organismos (CONAMA, 2011).

As descargas de efluentes industriais e domésticos nos rios são a fonte de poluição mais comum nesses ecossistemas, pois, vários efluentes contêm misturas tóxicas, como metais pesados, herbicidas, pesticidas e outros que, juntos, podem agravar as condições ambientais de um ecossistema aquático (HOSHINA & MARIN-MORALES, 2009).

## **2.5. Divisão Cyanobacteria**

Cianobactérias (cianoprocaríotos, cianofíceas ou algas azuis) representam um antigo, diverso e abundante grupo de micro-organismos que são pertencentes ao domínio Eubacteria por possuírem como principais características a presença de parede celular proteica semelhante à das bactérias gram-negativas (peptidoglicano), atividade fotossintética (fotossistema I e II) e ausência de organelas em seu citoplasma (STANIER & COHEN-BAZIRE, 1977).

As cianobactérias ocorrem numa grande variedade de morfologias sendo que a sua classificação tem sido baseada em características morfológicas simples. Possuem organização unicelular, filamentosa, ramificada ou pseudoramificada podendo ser envolvidas por uma fina ou difusa camada gelatinosa (bainha) ou permanecendo agrupadas em colônias. Algumas formas coloniais formam blooms de superfície que são reconhecíveis a olho nu. Existem diferentes tipos morfológicos de células que variam entre esférica, oval, fusiforme, bastonete ou irregular. Uma tendência evolutiva importante dentro da ordem Chroococcales (unicelulares e coloniais) é a polarização de células em talos possuindo um padrão de divisão celular específico (KOMÁREK, 2003).

Devido a sua diversidade morfológica, as cianobactérias podem ocupar ambientes com diferentes condições abióticas, como por exemplo, o ambiente desértico onde ocorre a dispersão desses organismos durante tempestades de poeira, conseqüentemente, ocupam diversos habitats e desempenham um importante papel na produção primária devido ao seu crescimento rápido após as chuvas sazonais, apresentando assim um papel ecológico na estabilização e fertilização de habitats áridos (METCALF et al., 2012).

Os gêneros *Microcystis* e *Anabaena* são comumente descritos como uns dos principais produtores de cianotoxinas hepatotóxicas (MCYSTs), devido a sua comum ocorrência em blooms

de ambientes sob contínuo processo de eutrofização e ampla distribuição geográfica (PIMENTEL & GIANI, 2013).

### 2.5.1. Gênero *Microcystis* sp.

O gênero *Microcystis* Kützing ex Lemmermann pertence à ordem Chroococcales e família Microcystaceae sendo um grupo estritamente colonial e cosmopolita. Possui dominância nos ambientes aquáticos onde é encontrado devido a sua rápida capacidade de movimento vertical, o que lhe permite explorar totalmente a coluna de água e obter as condições de luminosidade mais favoráveis (MELO-MAGALHÃES et al., 2009).

Uma das principais características desse gênero é a presença de envoltório mucilaginoso nas colônias sendo frequente a ocorrência de vesículas gasosas (aerótopos) nas células esféricas (GENG; QIN; YANG, 2013). Na distinção entre espécies para estudos taxonômicos ou cultivos unialgais, realiza-se o estudo da morfologia das colônias, podendo estas serem arredondadas, alongadas, com perfurações (clatradas), irregulares ou lobadas. Outra característica importante das colônias é quanto a espessura da mucilagem e sua visibilidade, podendo ser classificadas como facilmente perceptíveis (conspícua) ou não facilmente perceptíveis (inconspícua) (NOGUEIRA et al., 2011).

O cultivo de cianobactérias, dentre elas as do gênero *Microcystis*, possui uma vantagem econômica em relação a outros micro-organismos, uma vez que podem ser mantidas sem a necessidade de um substrato orgânico. Apesar de existirem extensivos estudos sobre o cultivo desses organismos e a produção de cianotoxinas, algumas espécies podem produzir outros diferentes tipos de peptídeos bioativos (ciano-peptídeos), como aeruginosinas, ciano-peptolinas, microgininas e microviridinas (SILVA-STENICO et al., 2011).

Dentre esses ciano-peptídeos as aeruginosinas são as mais estudadas sendo caracterizadas estruturalmente pela presença de peptídeos lineares que possuem atividade de inibição da protease - como a tripsina, plasmina e trombina (ISHIDA et al., 1999) - descritos pela primeira vez em *Microcystis aeruginosa* Kützing, esses peptídeos são caracterizados pela presença de quatro subunidades: um aminoácido N-terminal (ácido 3-4 hidroxifenil láctico - Hpla), um aminoácido hidrofóbico qualquer, um resíduo central de 2-carboxi-6-hydroxyoctahydroindol (Choi) e um grupo derivado da arginina C-terminal (LAUGHINGHOUSE et al., 2012).

O arranjo estrutural das aeruginosinas é responsável pela afinidade desta molécula pelo sítio catalítico de enzimas como a tripsina, trombina e outras serina proteases envolvidas na cadeia de reações da coagulação sanguínea. Devido as suas propriedades químicas e a possível

reatividade de seus grupos funcionais, essas substâncias devem ser mais estudadas para que possam ser enquadradas na legislação pertinente ao sistema de abastecimento público de água (SILVA-STENICO et al., 2012).

### **2.5.2. Gênero *Anabaena* sp.**

Assim como vários táxons dentro do grupo das cianofíceas, o gênero *Anabaena* tem sido identificado principalmente com base em suas características morfológicas, tais como a forma e tamanho dos tricomas, tamanho e localização dos heterocistos e acinetos e tipos de celulares. Entretanto, características bioquímicas e genéticas devem ser consideradas para a correta classificação desse gênero pois é comum a ausência ocasional dos heterocistos e acinetos devido a alterações fenotípicas sob diferentes condições ambientais (PRASANNA et al., 2006).

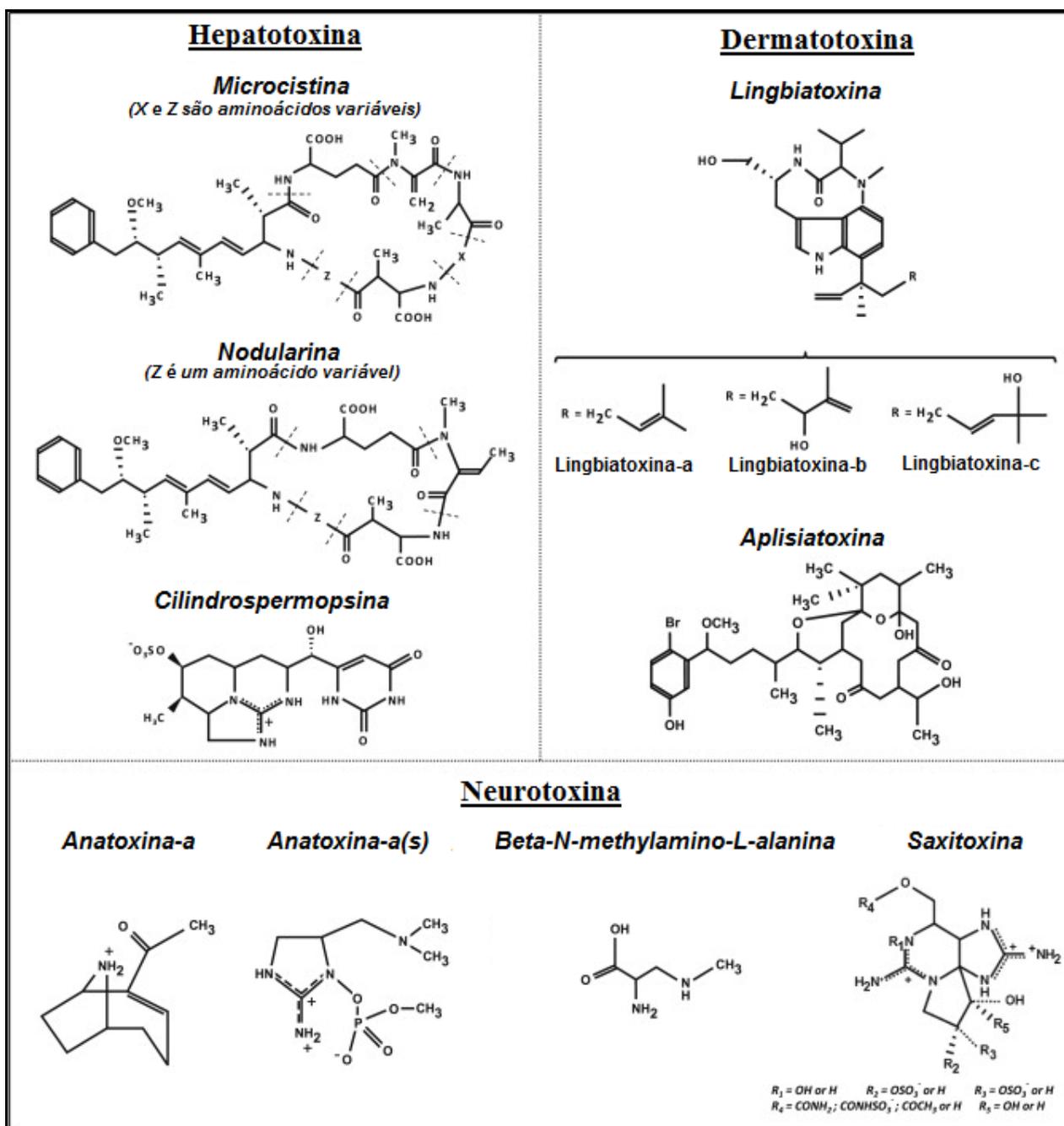
Espécies desse gênero possuem tricomas solitários ou aglomerados, retos ou curvos, geralmente longos, constrictos, com célula atenuada e hialina em pelo menos um dos ápices; envelope mucilaginoso ausente ou inconspícuo e hialino nas células vegetativas, heterocistos intercalares, com bainha rígida e esverdeada, levemente alongados ou sub-esféricos, distribuídos com mesma distância ao longo do tricoma (metaméricos); células vegetativas cilíndricas, hemi-esféricas, subquadráticas a quadráticas ou em forma de barril; conteúdo celular verde azulado, sem grânulos e com aerótopo central; parede celular espessa e verde azulada (SANTOS & SANT'ANA, 2010).

## **2.6. Cianotoxinas**

Com a eutrofização progressiva dos ambientes aquáticos e devido as mudanças climáticas os blooms de cianobactérias estão aumentando em muitas regiões do mundo e alterando a frequência e intensidade de ocorrência de alguns gêneros que produzem toxinas. Com o crescimento da biomassa destas cianobactérias também aumenta-se a produção de metabólitos odoríferos e tóxicos nos corpos hídricos (WERT et al., 2014).

Definido por sua estrutura química as cianotoxinas se dividem em quatro grupos: aminoácidos não proteinogênicos (beta-n-metilamino-L-alanina) peptídeos cíclicos (MCYSTs e nodularina), alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina, cilindropermopsina, aplisiatoxina, lingbiatoxina-a, lingbiatoxina-b, lingbiatoxina-c) e lipopolissacarídeos (ZEGURA; STRASER; FILIPIČ, 2011). No entanto, devido à sua ação farmacológica (Figura 3), as principais classes de cianotoxinas são as neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a (s), saxitoxina e beta-n-metilamino-L-alanina) e hepatotoxinas (MCYSTs, nodularina e cilindropermopsina) sendo as

últimas responsáveis pelas intoxicações mais comuns e frequentes (LAUGHINGHOUSE et al., 2012).



**Figura 3.** Estrutura química das principais cianotoxinas encontradas em *blooms* de cianobactérias em ambientes eutrofizados. (De acordo com: MEREL et al., 2013).

Em cianobactérias, a evolução e seleção de genes para a biossíntese não-ribossômica de peptídeos conduziu a formação de uma ampla variedade estrutural ao invés da complexidade funcional. Deste modo, a produção de oligopeptídeos parece ser vantajosa independentemente da

distribuição e localização geográfica, estado trófico e do habitat de cada espécie, já que, por ser um processo metabolicamente dispendioso, provavelmente teria sido perdido em uma linha evolutiva muito antiga nas cianobactérias (WELKER et al., 2006).

### 2.6.1. Microcistinas (MCYSTs)

As MCYSTs são heptapeptídeos monocíclicos que foram primeiramente isolados a partir de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* (WU et al., 2014). Dentre as mais de 90 variantes que já foram descritas, todas possuem em sua estrutura o ácido 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-dienóico (ADDA) como único aminoácido específico e diferem apenas quanto ao grau de metilação, hidroxilação, epimerização e sequência peptídica dos aminoácidos na posição dois e quatro (VALE et al., 2009).

Também são caracterizadas pela presença de um carbono eletrofílico no aminoácido N-metil-desidro-alanina (MDHA) que é o responsável pela inibição das fosfatases (PP-1, PP-2A e PP-2B) devido a formação de uma ligação covalente com o grupamento sulfidríla (SH) da cisteína dessas enzimas, causando assim um aumento da fosforilação proteica (ETCHEGARAY & BUENO, 2010).

Grande parte das MCYSTs são encontradas no meio intracelular, entretanto, podem rapidamente ser liberadas por lise devido a processos de senescência natural, uso de algicidas, estresse físico ou durante os processos de tratamento de água, aumentando assim a quantidade de MCYSTs extracelulares disponíveis (WERT et al., 2014).

A variante mais frequentemente estudada é a MCYST-LR tendo como aminoácidos variáveis a leucina (L) e a arginina (R), entretanto, outras variantes que também ocorrem com mais frequência são MCYST-RR (arginina-arginina), MCYST-YR (tirosina-arginina) e MCYST-LA (leucina-alanina) sendo também encontradas em diferentes gêneros (AMÉ et al., 2010).

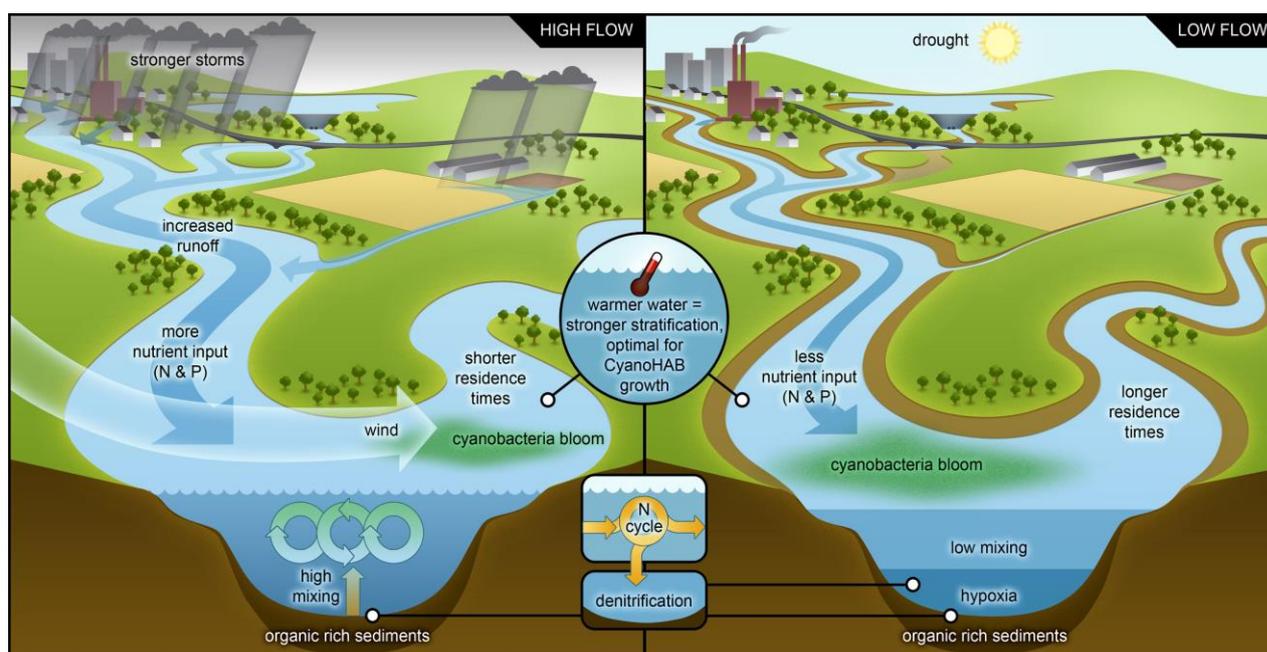
A estrutura da MCYST-LR é quimicamente referida como D-ALA-LEU-D-metil-ASP-ARG-ADDA-D-GLU-MDHA e assim como as suas demais variantes, é caracterizada por ser um peptídeo não ribossômico que possui três aminoácidos não proteicos, o ADDA, o ácido D-eritro-beta-metil-aspártico (D-Metil-ASP) e o MDHA (ETCHEGARAY & BUENO, 2010).

## 2.7. Métodos de Avaliação da Poluição Aquática

Águas residuais de indústrias, lavouras e pesqueiros são exemplos de misturas químicas complexas nas quais os efeitos biológicos são difíceis de se prever. Para a avaliação dos riscos ambientais da descarga de efluentes tóxicos em lagos, deve-se empregar diferentes espécies

biomonitoras, entretanto, no caso de misturas, análises químicas se fazem necessárias para que se definam os principais compostos poluentes presentes nesses ambientes (FISKESJÖ, 1985).

As interações entre o aquecimento, os cursos hidrológicos em mudança, a expansão agrícola e industrial e a distribuição de nutrientes para os ecossistemas aquáticos (Figura 4) exigem abordagens interdisciplinares para a melhor compreensão dos mecanismos de contaminação assim como para o gerenciamento das alterações e implicações sobre biota aquática (PAERL et al., 2016).



**Figura 4.** Efeito do período de seca e de chuva, da descarga e escoamento de contaminantes urbanos, do aumento da variabilidade hidrológica e das alterações nas condições físico-químicas e bióticas que modulam a composição fitoplanctônica nos ecossistemas aquáticos (PAERL et al., 2016). Sob as fortes condições pluviométricas do período chuvoso (à esquerda), ocorrerá um aumento na concentração de nutrientes, devido ao lixiviamento e com isso maiores taxas de crescimento das algas aumentando a biomassa fitoplanctônica. Em condições de seca, com águas que não fluem continuamente (à direita), o lixiviamento de nutrientes diminuirá, entretanto, a ausência de movimentação das águas, devido à pouca da ação dos ventos, promove um período de estratificação vertical que permite que as cianobactérias flutuantes dominem a superfície do corpo hídrico.

### 2.7.1. Parâmetros de Análise Química

Dentre os poluentes orgânicos mais estudados em ecotoxicologia estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (TRAVEN, 2013), pesticidas como o paration (SHARBIDRE; METKARI; PATODE, 2011a), herbicidas como o glifosato (LOPES et al., 2014) e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (UYANIKGIL et al., 2009), por se tratarem de contaminantes

provenientes de ação antrópica e por possuírem mecanismos de ação conhecidos em seus aspectos bioquímicos, celulares, histológicos e sistêmicos (SOUZA FILHO et al., 2013).

O aumento das atividades antrópicas nas metrópoles tem causado impactos ambientais nos ecossistemas devido ao crescente número de automóveis e aeronaves que emitem combustíveis responsáveis pela produção de hidrocarbonetos não metano (NMHCs), como por exemplo o grupo dos HPAs. Esse grupo de hidrocarbonetos são originários principalmente de fontes antropogênicas de poluição atmosférica, sendo atualmente um assunto de preocupação pública devido a sua deposição no solo, rios e lagos (RAY et al., 2008).

Assim como o setor de transporte as indústrias químicas são responsáveis pela produção de compostos poluentes (herbicidas, pesticidas) que, quando lixiviados, se acumulam sobre lagos e rios desencadeando a contaminação de organismos aquáticos como os peixes, microinvertebrados e algas. Herbicidas como o 2,4-D e o glifosato, que são agentes químicos empregados no aumento do rendimento agrícola, apresentam característica hidrofílica e podem facilmente ser lixiviados para os corpos receptores (UYANIKGIL et al., 2009).

A poluição aquática desencadeada pelo processo de urbanização das cidades também está relacionada com o lançamento de metais pesados em corpos hídricos como rios e lagos. Dentre os metais pesados comumente observados em amostras ambientais, o cobre é um importante elemento químico para os organismos aquáticos sendo a sua concentração relacionada com a atividade da catalase, no entanto, quando se encontra em concentrações não fisiológicas, ocorre um desequilíbrio oxidativo formando radicais livres que podem se ligar a biomoléculas como o DNA gerando estresse oxidativo (EYCKMANS et al., 2011).

Assim, em elevadas concentrações eles são considerados poluentes inorgânicos que podem colocar em risco não somente a saúde animal, mas também a humana e a vegetal. Nesse sentido, faz-se necessária a determinação da concentração de cobre em pesqueiros e efluentes pesqueiros como uma estratégia de gestão dos recursos hídricos para que não ocorra a contaminação de diferentes níveis tróficos, assim como da população consumidora do pescado (PAPAGIANNIS et al., 2004).

### **2.7.2. Genotoxicidade de Xenobióticos**

O material genético da maioria dos seres vivos - apesar de encontrar-se no interior das células, protegido por membranas, imerso no citoplasma e com um complexo sistema de reparo - não está livre de sofrer constantes alterações em sua estrutura devido às interações com agentes químicos ou aos erros ocorridos durante o processo divisão celular (GRIFFITHS et al., 2008).

Quando as mutações genéticas afetam as células somáticas, os efeitos são observados no próprio indivíduo, pois é possível observar redução ou perda de função da célula atingida. Já quando a mutação genética ocorre em células germinativas, os efeitos destas alterações são observados na prole, que apresenta desde disfunções orgânicas até a morte do indivíduo (GRIFFITHS et al., 2008).

Segundo Zapata et al. (2016) estas alterações podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devidas à exposição dos organismos a agentes biológicos, físicos ou químicos (mutações induzidas) como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados, herbicidas, pesticidas, solventes, etc.

Nesse sentido é importante o uso de ferramentas toxicológicas que possibilitem a avaliação da integridade do material genético exposto à esses agentes. Dentre os métodos empregados para a avaliação da genotoxicidade o Ensaio Cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) é um método rápido e muito sensível para mensurar as lesões no DNA em células individuais de diversas espécies de eucariotos (TICE et al., 2000; COLLINS et al., 2008).

É uma ferramenta de avaliação da genotoxicidade de compostos xenobióticos e diversos agentes químicos, sendo amplamente utilizada devido à grande praticidade de realização do ensaio e relativa simplicidade de execução do método. Este teste detecta lesões genômicas que após serem processadas podem resultar em mutação (ARALDI et al., 2015).

A metodologia desenvolvida por Singh et al. (1988), no qual o ensaio cometa era realizado em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ), possibilitou uma intensificação e uma maior eficiência da técnica. Essa alteração no método proporcionou a detecção conjunta de quebras de fita simples, quebras de fita dupla, sítio álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (TICE et al., 2000).

### **2.7.3. Atividade da Catalase, Carboxilesterase e Glutathione-S-Transferase**

Um grande número de estudos têm utilizado biomarcadores bioquímicos como ferramentas na avaliação da ecotoxicidade desses compostos químicos (LETICIA & GERARDO, 2008). As interações entre xenobióticos e os sistemas biológicos, de organismos como os peixes, podem promover alterações sobre as atividades bioquímicas, as quais podem ser utilizadas como bioindicadoras de toxicidade em ensaios laboratoriais ou na avaliação de poluentes ambientais (SHARBIDRE et al., 2011).

Em organismos expostos, os xenobióticos, após absorção e distribuição, podem ser detoxificados ou ativados durante a biotransformação – na fase I ou II – o que definirá se o metabólito originado por esse processo terá algum efeito sistêmico, patológico, genotóxico ou se somente seguirá para as vias de excreção (COSTA et al., 2012; JAVED et al., 2016).

Assim, é importante se avaliar as enzimas da fase I e II da biotransformação tal como as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (GUMPU et al., 2015; RIBALTA et al., 2015) tendo em vista que mudanças na atividade dessas enzimas podem auxiliar na detecção precoce de uma exposição a contaminantes, podendo diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos nos organismos expostos (GONZÁLEZ et al., 2009).

A fase I da biotransformação inclui essencialmente as reações de oxidação, redução e hidrólise. Dentre as enzimas relacionadas à fase I está a carboxilesterase (CarbE, EC 3.1.1.1) – uma serino-hidrolase – importante por promover o aumento da hidrofiliabilidade dos compostos, adicionando um grupamento polar nos xenobióticos lipofílicos que possuam grupamento éster carboxílico (SOLÉ & SANCHEZ-HERNANDEZ, 2015).

Na fase II da biotransformação ocorrem as reações de síntese – como a glicuronidação, sulfatação, metilação e conjugação com aminoácidos ou com a glutatona – sendo a glutatona-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) uma das enzimas mais estudadas desse grupo por representar até 10% do total de proteínas citosólicas do fígado (HANUS et al., 2008). Sua importância também é atribuída ao fato de, juntamente com outras enzimas, ser responsável pelo maior aumento na hidrofiliabilidade de compostos xenobióticos, promovendo a excreção desses compostos (FRASCO & GUILHERMINO, 2002).

Comumente, como um dos produtos das reações de biotransformação dos xenobióticos também tem-se a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que correspondem aos produtos da redução do oxigênio molecular nas formas do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), dentre outros (AHMAD et al., 2000). As enzimas antioxidantes podem ter sua síntese induzida pelo aumento das concentrações de ROS, sendo esse um mecanismo celular de proteção para a contenção do stress oxidativo (ZHANG et al., 2012).

Assim, faz-se importante a avaliação da atividade de enzimas que compõem parte do sistema de defesa antioxidante, como a catalase (CAT, EC 1.11.1.6), uma vez que essa enzima protege os tecidos e células contra o dano induzido pelas EROs sendo encontrada em vários órgãos de praticamente todos os organismos aeróbios (VASYLKIV et al., 2011). A CAT é uma enzima oxidoreductase que catalisa a conversão de duas moléculas de peróxido de hidrogênio,

composto instável e altamente reativo, em duas moléculas de água e uma de gás oxigênio (GONÇALVES-SOARES et al., 2012).

É frequente em literatura o uso de biomarcadores enzimáticos (CarbE, GST, CAT, dentre outros) sem se ter definido as condições ótimas de pH e da concentração dos substratos. Nessas condições, esses resultados não representam a atividade das enzimas em seu estado ótimo o que inviabiliza comparações com outros estudos assim como a interpretação dos próprios resultados (BASTOS et al., 2013).

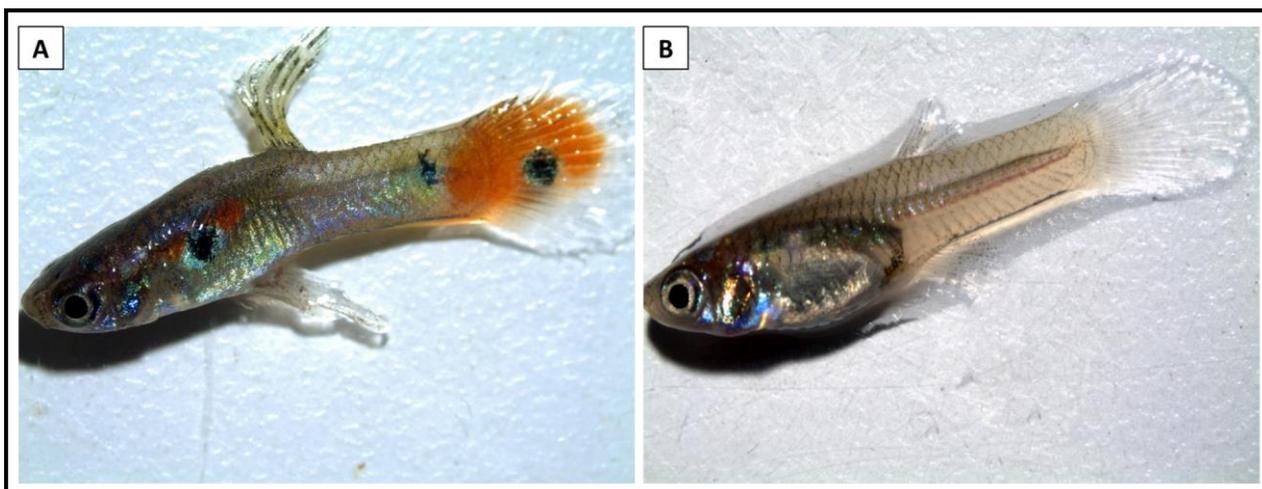
#### **2.7.4. *Poecilia reticulata* como Modelo Biológico**

Segundo MACHADO et al. (2013) estudos que relacionam biomonitores de níveis tróficos distintos assim como diferentes biomarcadores (genéticos, bioquímicos, etológicos, histológicos, morfológicos e enzimáticos) são necessários para o processo de biomonitoramento de um corpo hídrico, bem como para se estabelecer a relação entre o grau da resposta toxicológica dos biomarcadores e a condição de saúde ambiental.

A família Poeciliidae é compreendida por espécies que, em sua maioria, possuem pequeno porte e são encontradas em climas tropicais, dentre essas, a espécie *Poecilia reticulata* (popularmente conhecida como “guppy” ou guaru) é originária da América Central (Caribe), embora também seja nativa da Venezuela, Suriname, norte do Brasil, Trinidad e Tobago, Barbados, México e Guiana (MURILLO et al., 2014).

Os guarus foram introduzidos em muitas regiões do mundo como uma importante espécie para o controle biológico atuando na predação de larvas de mosquito, além de haver interesse em torna-lo um peixe ornamental, com isso, ocorreu a sua ampla distribuição geográfica, onde passou a ser caracterizado como uma espécie cosmopolita (MONTAG et al., 2011).

Indivíduos da espécie *P. reticulata* apresentam dimorfismo sexual (Figura 5) e são caracterizados por apresentarem seu corpo coberto por escamas, nadadeira anal curta com 10 raios ou menos, sendo que, em indivíduos machos que se encontram em fase reprodutiva, essa nadadeira é modificada em uma estrutura copuladora denominada de gonopódio. Indivíduos machos possuem ainda manchas esféricas negras (ocelos) e regiões de coloração variada na metade posterior do corpo e na nadadeira dorsal. As fêmeas apresentam coloração castanho claro uniforme, ventre acinzentado, nadadeiras hialinas e, quando adultas, são maiores quando comparadas aos machos (CASTRO et al., 2004).



**Figura 5.** Dimorfismo sexual entre espécimes de *Poecilia reticulata*. (A) Espécime macho de *P. reticulata* com ocelos negros em regiões de coloração alaranjada nos flancos, no pedúnculo caudal e nas nadadeiras. (B) Espécime fêmea de *P. reticulata* caracterizada pela presença de flancos e dorso na coloração castanho claro uniforme, apresentando o pedúnculo caudal, nadadeira dorsal e anal com aspecto hialino.

Em geral, os machos que apresentam coloração alaranjada mais intensa e ocelos mais nítidos são preferidos pelas fêmeas tendo maior sucesso reprodutivo, entretanto, o tamanho do macho também se relaciona com o sucesso de cópula, e com a sua susceptibilidade à predação. Assim em *P. reticulata*, o tamanho reduzido do macho em relação à fêmea se deve ao fato das cores em animais maiores serem percebidas com facilidade pelos predadores determinando assim uma seleção direcional, prevalecendo em sua maioria os machos com menor porte.

*P. reticulata* é um peixe vivíparo que possui desenvolvimento embrionário com a duração de 25 a 30 dias, entretanto, o intervalo de variação desse período depende da temperatura da água e da dieta que é destinada à fêmea. Nessa espécie a ovoviviparidade se desenvolveu como um mecanismo de proteção contra condições ambientais adversas e como uma tentativa de diminuir o frequente canibalismo que é comum nesse grupo, onde os pais comem seus filhotes logo após o nascimento (MURILLO et al., 2014).

De modo geral, as características ecológicas relacionadas com a variada dieta dos guarus possibilitam a sua sobrevivência em ambientes que sofreram alterações antrópicas, condições estas que muitas outras espécies não suportariam. Assim, muitas espécies da família Poeciliidae, principalmente *P. reticulata* são usadas como indicadoras da integridade dos habitats aquáticos por meio do estudo de suas características bioquímicas, fisiológicas, anatômicas, histológicas e etológicas (MONTAG et al., 2011).

Os organismos recomendados para os testes toxicológicos e para os processos de classificação de risco ambiental devem ser de importância significativa na cadeia trófica aquática (VILLARROEL et al., 2003). Nesse contexto, a espécie *Poecilia reticulata* apresenta-se como eficaz por se tratar de um organismo que faz parte da cadeia alimentar, além de ser indicado em normas de estudos toxicológicos por órgãos competentes para se realizar os ensaios ecotoxicológicos (OECD, 1992).

É comum na literatura científica a referência a utilização de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos (SANTOS et al. 2012; SINHIRIN et al. 2014), entretanto, a captura desses organismos, em ambientes naturais, com a finalidade de uso em ensaios laboratoriais, pode ser considerada de caráter predatório, visto que dificilmente são cultivadas por possuírem reprodução sazonal. Por outro lado, a espécie *Poecilia reticulata* pode ser utilizada rotineiramente, tanto pela sensibilidade equivalente a algumas espécies nativas de caracídeos (*Hemigrammus marginatus* e *Serrapinnus notomelas*) como pela relativa facilidade de cultivo, além de ser uma espécie que possui reprodução contínua ao longo do ano (BERTOLETTI, 2009).

Uma vasta informação sobre a sensibilidade de *Poecilia reticulata* em comparação com outras espécies de peixes, como *Brachydanio rerio*, *Cyprinus carpio*, *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas*, *Salmo gairdneri* pode ser obtida em estudo realizado por Vittozzi e Angelis (1991). Os bioensaios que utilizam *P. reticulata* como modelo biológico demonstram ser uma excelente forma de se monitorar lagos (ARAÚJO et al., 2006), sobretudo os eutrofizados, sendo os estudos em laboratório indicados pela possibilidade de se controlar as variações abióticas que alterariam os resultados da análise, portanto, esse método de exposição torna-se mais preciso, uma vez que reflete somente o efeito de contaminantes aquáticos (misturas) sobre os organismos aquáticos.

Mediante a intensa contaminação dos corpos hídricos por diferentes cargas poluidoras, tem sido crescente o interesse em se utilizar sistemas testes rápidos e sensíveis para a detecção da toxicidade de produtos químicos e misturas complexas, tais como os contidos em efluentes pesqueiros, industriais, agrícolas e domésticos (RANK& NIELSEN, 1994).

### **3. Justificativa**

Devido aos diversos casos de intoxicação de organismos aquáticos por compostos como as cianotoxinas, HPAs e os metais pesados, estudos ecotoxicológicos em lagos sob eutrofização antrópica, como grandes pesqueiros urbanos, são necessários para se estimar o risco associado a esses contaminantes assim como a variação de suas concentrações devido à sazonalidade.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo Geral

Caracterizar a comunidade fitoplanctônica e realizar estudo ecotoxicológico de contaminação de peixes por poluentes orgânicos e inorgânicos em um lago artificial pesqueiro de Goiânia/Goiás, no período de seca e chuva, utilizando *endpoints* comportamentais, histopatológicos, genotóxicos e enzimáticos para o entendimento de processos de intoxicação de peixes sob efeito agudo de contaminantes aquáticos.

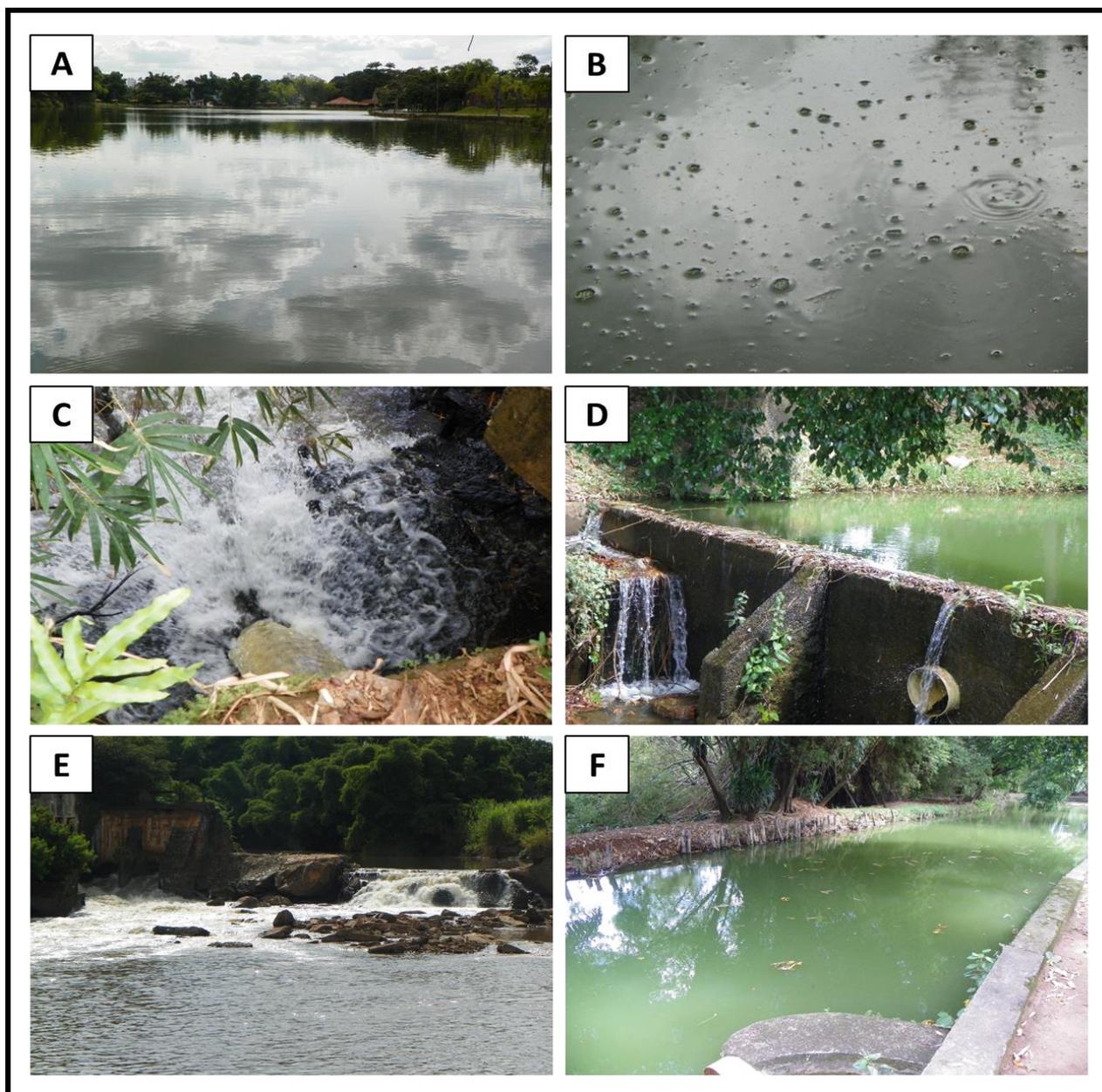
### 4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o corpo d'água quanto a composição fitoplanctônica e suas características físico-químicas;
- Analisar o corpo hídrico quanto a presença de algicidas (metais pesados), herbicidas, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e outros compostos inorgânicos como possíveis agentes agravantes da toxicidade aquática;
- Quantificar a cianotoxina microcistina-LR no efluente pesqueiro do período de seca e de chuva utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Investigar os efeitos tóxicos do efluente pesqueiro, do período de seca e chuva, sobre *Poecilia reticulata* avaliando os distúrbios comportamentais e a mortalidade de machos e fêmeas por exposição aguda;
- Avaliar os efeitos histopatológicos na porção medial do intestino delgado e a possível deposição de  $\text{Cu}^{2+}$  sobre o parênquima hepático de *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro;
- Determinar os efeitos genotóxicos em eritrócitos de indivíduos de *P. reticulata* expostos ao efluente pesqueiro utilizando a técnica do ensaio cometa alcalino;
- Verificar o efeito da exposição ao efluente pesqueiro sobre a atividade específica da catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e carboxilesterase (CarbE).

## 5. Área de Estudo

A cidade de Goiânia (Goiás, Brasil) possui uma população de cerca de 1,4 milhões de habitantes, altitude aproximada de 749 metros acima do nível do mar sendo o cerrado (conhecido como Savana Brasileira) sua vegetação predominante segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014). O clima da região é caracterizado por duas estações bem definidas: a estação de seca (maio à setembro) e a estação de chuva (outubro à abril) (FRANZ et al., 2013).

Segundo NOGUEIRA et al. (2011) na região nordeste do município de Goiânia se encontra o pesqueiro Jaó, um lago artificial localizado no setor Jaó ( $16^{\circ}39'13''$  S- $49^{\circ}13'26''$  O) destinado à criação e consumo de peixes, além de ter instalações para a prática de esportes aquáticos (Figura 6).



**Figura 6.** Aspectos gerais do lago artificial do Clube de Pesca Jaó e seus efluentes. (A) Clube de Pesca Jaó (B) adensamento de algas e cianobactérias na lâmina superficial do pesqueiro (C) Rio Meia Ponte sendo corpo receptor do efluente do pesqueiro; (D) corpo hídrico apresentando coloração esverdeada intensa devido ao acúmulo de algas e cianobactérias; (E) antiga barragem da usina hidrelétrica Jaó; (F) grande biomassa fitoplactônica no curso de despejo no Rio Meia Ponte.

Esse lago possui nascente situada no Aeroporto Santa Genoveva, que devido ao fluxo de automotores pode ocorrer a contaminação de sua nascente com produtos de combustão incompleta como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e particulados sólidos como as fuligens. Outra característica importante das águas que abastecem esse lago é que durante o seu percurso da nascente até o pesqueiro, há uma grande extensão territorial urbana que por meio da lixiviação de resíduos, pode promover a contaminação desse pesqueiro.

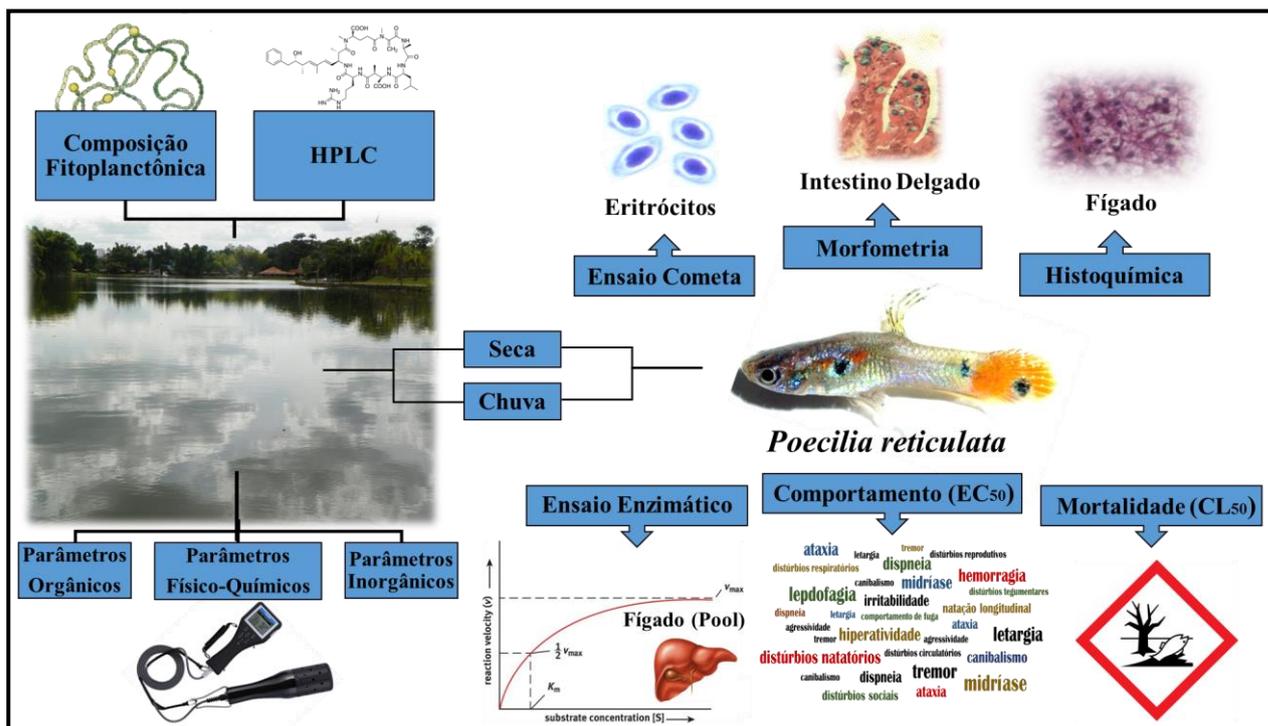
De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) esse pesqueiro possui características que o enquadra segundo a Resolução nº 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos. Tendo em vista que esse pesqueiro desagua no Rio Meia Ponte – um dos responsáveis pelo abastecimento dos municípios de Goiânia, Trindade e Aparecida de Goiânia – ele também é classificado segundo a Resolução nº 430/2011 que dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes.

O pesqueiro Jaó tem suas origens na primeira usina geradora de energia elétrica da cidade de Goiânia, a hidrelétrica Jaó, que se localizava em uma represa no trecho do Rio Meia Ponte (OLIVEIRA, 2011). Entretanto, em 1945, após danos estruturais, a hidrelétrica Jaó deixou de funcionar normalmente e em 1970 foi desativada, sendo a barragem da usina demolida (Figura 6, E) e em seu lugar construído um lago artificial, abastecido pelo único manancial não poluído da cidade de Goiânia, surgindo assim o Clube Jaó (LEITE, 2011).

## 6. Material e Métodos

Para a realização desse estudo foram feitas amostragens, no período de seca e de chuva, da água do lago artificial do Clube de Pesca Jaó, tendo como finalidade a análise da composição fitoplanctônica, a caracterização da cianotoxina microcistina-LR pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) e a determinação de parâmetros orgânicos, inorgânicos e físico-químicos (Figura 5).

Após essas caracterizações, foram realizadas exposições agudas, com *Poecilia reticulata* como modelo biológico, para a elucidação da possível toxicidade das águas desse lago, por meio de análises de genotoxicidade (ensaio cometa em eritrócitos), morfométricas (em intestino delgado), histoquímicas e enzimáticas (em fígado), das alterações comportamentais e da taxa de mortalidade dos espécimes expostos (Figura 07).



**Figura 7.** Representação esquemática das análises físicas, químicas e biológicas realizadas no lago artificial do Clube de Pesca Jaó e dos ensaios de toxicidade (histológicos, enzimáticos, comportamentais, de mortalidade e de genotoxicidade) realizados nos espécimes de *P. reticulata* expostos às amostras de água desse lago.

### 6.1 Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e orgânicos

O município de Goiânia, situado na região centro-oeste do estado de Goiás, tem como característica de sua sazonalidade os climas úmidos tropicais com apenas duas estações bem definidas, a seca no inverno e úmida no verão (PÉROLA et al., 2012). Assim, foram realizadas coletas de água no período de seca (julho/2014) e de chuva (novembro/2014) sendo as amostras de água superficial do pesqueiro armazenadas em frascos do tipo âmbar, vedadas e mantidas sob refrigeração a temperatura de 4°C em caixa térmica, sendo posteriormente encaminhadas para análise laboratorial de parâmetros orgânicos e inorgânicos.

Parâmetros como pH, temperatura, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD) e sólidos totais dissolvidos (STD) foram amostrados em campo, utilizando uma sonda multiparâmetros Horiba U50. Dentre os parâmetros orgânicos foram analisados clorofila a, O,O-dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato (paration), N-fosfometil-glicina (glifosato), ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno(1,2,3,cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e dentre os inorgânicos o nitrito, nitrato, cobre, cloreto, nitrogênio e fósforo. A razão entre o nitrogênio total e o fósforo total (N:P) foi calculada por essa permitir classificar os

cursos d'água em classes categóricas, ou seja, em níveis que determinam o estado trófico de um lago (KIM & KIM, 2013).

## 6.2 Análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton

Para a análise qualitativa foram efetuadas coletas de arrasto com rede de plâncton (20 µm) sendo as amostras fixadas em formol a 4%, acondicionadas em frascos âmbar E mantidas sob ausência de luminosidade (Gkelis & Zaoutsos 2014) a temperatura de 4°C. O material qualitativo foi utilizado para uma triagem inicial das cianobactérias e as amostras para identificação morfológica foram encaminhadas ao Laboratório de Análise e Gerenciamento Ambiental de Recursos Hídricos – LAMARH, da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Para o estudo quantitativo das cianobactérias planctônicas, as amostras foram coletadas da lâmina d'água superficial, fixadas em lugol acético a 5%, sendo posteriormente decantadas em câmara de sedimentação de Utermöhl e examinadas em microscópio invertido com o aumento de 450x. Para identificação dos táxons, foi utilizada a chave de classificação dicotômica proposta por Nogueira e colaboradores (2011), sendo esta específica para o lago artificial pesqueiro do Jaó. A quantificação dos organismos foi realizada por meio da contagem de campos aleatórios até que se estabilizasse a curva de acumulação de espécies (CHAPMAN, 2006).

No estudo quantitativo a densidade do fitoplâncton (indivíduos.mL<sup>-1</sup>) foi determinada pelo método de Utermöhl (1958) a partir da fórmula:

$$V_{tc} = (sc \cdot nc \cdot h) / 10^9$$

Onde: **V<sub>tc</sub>** = Volume Total Contado (mL)

**sc** = Área do Campo de Análise (µm)

**nc** = Número de Campos Aleatórios Contados

**h** = Altura da Câmara de Contagem (mm)

Aplicando-se o Volume Total Contado (**V<sub>tc</sub>**) na fórmula abaixo tem-se o Fator de Contagem (**F<sub>c</sub>**):

$$F_c = 1/V_{tc}$$

Ao final dos cálculos a determinação da concentração de indivíduos é dada pelo produto do fator de contagem (**Fc**) pelo total de indivíduos contados (**Tic**) em todos os campos aleatórios (**indivíduo.mL<sup>-1</sup> = Fc . Tic**).

### 6.3 Caracterização da Microcistina L-R por HPLC

Dentre os métodos disponíveis para a caracterização da cianotoxina microcistina L-R em um corpo hídrico estão os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), ensaios com inibidor de fosfatase (PP1A e PP2A), cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) e cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC/MS) (SIVOVEN, 2008).

Para a caracterização da microcistina-LR as amostras de água foram coletadas, concentradas 10x em rede de arrasto, armazenadas em frascos de vidro âmbar e acondicionadas em caixas de isopor com gelo, sendo posteriormente transportadas ao Laboratório de Cromatografia Líquida do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade de Brasília - UnB, onde foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C. O processo de extração em fase sólida (SPE) foi realizado em amostras de água bruta e no bloom liofilizado, conforme especificações definidas por SANCHES *et al* (2007) com modificações.

As amostras de água bruta foram pré-filtradas em papel filtro e posteriormente em filtro *Millipore*® de microfibras de vidro (pré-filtro AP20) com retenção nominal de 0,8 a 8 micra (47mm de diâmetro). Para o método de SPE foi utilizado sistema de kitassato acoplado a cartucho C<sub>18</sub> onde a amostra bruta pré-filtrada foi novamente concentrada em cartucho previamente limpo com 20 mL de água ultra pura, ativado com 6 mL de metanol seguido de 6 mL de água ultra pura.

Após a concentração das amostras em cartucho C<sub>18</sub> realizou-se a etapa de *clean-up* (aplicação sob vácuo de 20mL de água ultra pura) para que o sorvente ficasse livre de conteúdos residuais da matriz aquosa. Após a completa secagem do sorvente, este foi novamente eluído em 10 mL de metanol e armazenado sob refrigeração em tubos *Falcon*® sendo as amostras contendo o analito mantidas ao abrigo da luz. Para a remoção do metanol e posterior diluição do analito na fase líquida para cromatografia, utilizou-se um concentrador a vácuo da marca *Speed Vac*® a temperatura de 35±5°C.

Para a caracterização do conteúdo de microcistina-LR no concentrado do fitoplâncton o bloom concentrado congelado (5x) foi submetido ao processo de liofilização nas condições de 96 µHg; -40°C; 214±2 vca, onde o produto resultante da sublimação foi denominado de extrato seco. Para diluição do analito pesou-se 5mg do extrato seco e o diluiu em 20mL de metanol sendo mantido sob constante homogeneização por um período de 2 horas. Posteriormente, para uma

melhor separação do analito do extrato bruto, as amostras diluídas em metanol foram centrifugadas (10 minutos; 3000 RPM), de modo que o sobrenadante foi reservado e o *pellet* (corpo de fundo) novamente ressuspensão em 20mL de metanol P.A, sendo esse processo realizado três vezes. Ao final desse processo o volume final de metanol obtido (60 mL) contendo o analito de interesse foi concentrado em centrífuga a vácuo (*Speed Vac*®) a temperatura de 35°C, obtendo-se assim o extrato seco. Após essa etapa a matriz para SPE foi obtida diluindo o extrato seco em 20mL de água ultra pura, onde se prosseguiu da mesma forma como a descrita para o método de SPE para as amostras de água bruta.

As frações extraídas da água bruta e do concentrado do fitoplâncton foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando as condições cromatográficas ideais para a determinação da microcistina-LR conforme descrito por PAVAN DA SILVA *et al* (2011).

A cromatografia foi realizada sob condições isocráticas utilizando coluna C<sub>18</sub> de fase reversa (Synergi Fusion- RP 4I80 (250 x 4, 60mm; Phenomenex), fase móvel de 20mM de formiato de amônio, pH 5,0 e acetonitrila (7:3) durante o período de 30 minutos de corrida. A identificação das microcistinas em água bruta e no concentrado de algas foi realizado pela comparação do índice de semelhança com o espectrograma do padrão de microcistina-LR (SIGMA, CO) sendo a absorvância definida para a faixa de comprimento de onda de 200-300nm.

#### **6.4 Dieta dos espécimes de *Poecilia reticulata***

Os espécimes de *Poecilia reticulata* (guaru) foram obtidos em comércio local (Goiânia, GO) mantidos sob condições padronizadas segundo a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992). Para que se tivesse uma maior confiabilidade quanto à qualidade do lote de peixe obtido comercialmente, estes, foram alimentados diariamente, *ad libitum*, com náuplios *Artemia* spp. (Leach, 1819), sendo essa alimentação complementada com larvas de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) por serem uma rica fonte de proteínas.

Em todos os ensaios foram utilizados indivíduos machos e fêmeas, ambos adultos, sendo previamente analisados quanto a presença de ectoparasitas, endoparasitas ou quaisquer alterações morfoanatômicas, de modo que, quando alterados ou infectados foram removidos do grupo de aclimação e destinados aos aquários de quarentena (MACEDA-VEIGA; MONROY; DE SOSTOA, 2012).

#### **6.5 Aclimação**

Durante todo o período de aclimação, a qualidade da água dos aquários foi verificada onde o pH foi mantido entre  $7,4 \pm 0,1$ , a concentração de oxigênio maior que 80%, a dureza de 13

DH (WESTER & CANTON, 1987) e a temperatura de  $23 \pm 2$  °C, todos de acordo com o definido pela normatização número 203 da OECD.

Em seu ambiente natural os espécimes de *P. reticulata* vivem em águas com temperatura que varia de 16 a 30 °C, tendendo a permanecer nas regiões mais quentes da coluna d'água, assim, sabe-se que em biotérios e tanques de aquarofilia a temperatura ótima de manutenção dos espécimes se encontra entre o intervalo de 25 a 28 °C (MURILLO et al., 2014).

Em alguns ensaios ecotoxicológicos a água de manutenção dos espécimes e diluição das amostras dos efluentes, geralmente, apresenta constituição não conhecida, o que pode tornar os bioensaios indevidos pela possibilidade dessas águas conterem diferentes concentrações de metais pesados, particulados de matéria orgânica, entre outros compostos químicos, que poderiam contribuir para o aumento da toxicidade das amostras testes, talvez, por um efeito sinérgico (BERTOLETTI, 2009).

A OECD, em sua normatização número 203 (1992), recomenda que a água para a manutenção dos espécimes seja preparada a partir de quatro soluções salinas (Tabela 1), assim como a água destinada aos bioensaios e para a realização das trocas parciais, visando a diminuição da concentração de amônia tóxica, sólidos totais dissolvidos (STD), nitrito e nitrato.

**Tabela 1.** Soluções salinas empregadas para o preparo da água de manutenção (água doce artificial) de espécimes de *P. reticulata* segundo normatização n° 203 (OECD, 1992).

Solução	A	B	C	D
Solutos (Sais)	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	NaHCO <sub>3</sub>	KCl
Massa Molecular	147,015	246,475	84,007	74,551
Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	11,76	4,9	2,59	0,23

Para a obtenção da solução final diluiu-se as soluções de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) e cloreto de potássio (KCl) para um volume final de 40 litros obtendo assim as concentrações de 294 mg.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O; 122,5 mg.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 64,75 mg.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> e 5,75 mg.L<sup>-1</sup> de KCl. Após diluição, a solução final foi mantida sob aeração por um período de 48 horas e somente após esse período foi utilizada para a manutenção dos animais.

Todos os procedimentos de aclimação dos espécimes de *Poecilia reticulata*, assim como as condições necessárias para a realização do bioensaio de exposição aguda (Tabela 2) foram

adotadas conforme o preconizado pelo Guia da OECD (n°203, 1992) "Guia para Testes Químicos" o que determina as condições de experimentação utilizadas nesse estudo.

**Tabela 2** – Critérios para a realização de bioensaios com peixes definidos pelo Guia para Testes Químicos (n° 203) da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

<b>Manutenção dos Espécimes</b>	
<b>Luminosidade</b>	Fotoperíodo de 12 horas (12:12)
<b>Temperatura</b>	Entre 21 e 25°C
<b>Oxigênio Dissolvido</b>	> 80%
<b>Alimentação</b>	Três vezes por dia, até 24 horas antes do início do bioensaio
<b>Critérios de Avaliação do Lote de Peixes</b>	
Mortalidade superior a 10 por cento da população em sete dias: Rejeição de todo o lote;	
Mortalidade de 5 e 10 por cento da população: aclimatação continua por mais sete dias;	
Mortalidade inferior a 5 por cento da população: aceitação do lote.	
<b>Critério de Experimentação</b>	
A mortalidade no grupo controle deve ser inferior a 10 por cento em até 96 horas	

Segundo OECD (1992).

### **6.6. Bioensaios para avaliação da toxicidade do efluente**

Após aclimatação, 250 machos e 250 fêmeas de *P. reticulata* foram distribuídos aleatoriamente em 25 aquários (10 machos e 10 fêmeas por aquário) com dimensões de 30cm x 14cm x 20cm (comprimento x largura x altura). O grupo experimental foi composto pelo controle negativo (mantido em solução padrão de água doce artificial) e as concentrações de 100; 75; 50 e 25% do efluente do pesqueiro, sendo realizada exposição aguda, em um sistema estático de aeração constante por um período de 96 horas.

Durante toda a exposição a água foi mantida na temperatura de  $25 \pm 1$  °C, pH  $7,4 \pm 1$ , oxigênio dissolvido de  $6,73 \pm 0,54$  mg.L<sup>-1</sup> (81,73% de saturação) e salinidade de  $0,02 \pm 0,00378\%$ . A mortalidade dos peixes foi verificada por um período de quatro dias, de modo que a cada 24 horas os peixes mortos foram removidos imediatamente para evitar efeitos adversos como contaminação fúngica, bacteriana e a elevação da concentração de amônia tóxica - devido ao início decomposição dos organismos.

### 6.6.1. Concentração letal do cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ )

Para que fosse verificada a toxicidade do cobre sobre os espécimes de *P. reticulata*, utilizando dessa concentração letal média para 96 horas de exposição ( $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ) do  $\text{CuSO}_4$  como controle positivo de contaminação por cobre, realizou-se a exposição dos peixes a concentração letal média do sulfato de cobre definida por BERTOLETTI (2009) para espécimes de *P. reticulata* mantidos em águas moderadamente duras ( $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  de  $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ ), entretanto, não foi observada nenhuma mortalidade dos indivíduos expostos, assim, houve a necessidade que se definisse uma nova  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  do  $\text{CuSO}_4$  para os *guppies*.

Para isso, foram realizadas dez diluições do  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,012; 0,078; 1,17; 1,56; 1,95; 2,34; 2,73; 3,12; 4,69; 6,25  $\text{mg.L}^{-1}$ ), utilizando água doce artificial sendo cada solução homogeneizada por trinta minutos em agitador magnético, sendo esse período necessário para a completa dissociação desse sal. Os espécimes que compreenderam o grupo controle negativo foram mantidos em aquários separados em solução padrão de água doce artificial. Como o sulfato de cobre somente é encontrado comercialmente em sua forma pentahidratada ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) foram realizados cálculos de proporção entre a massa molar do  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e do  $\text{CuSO}_4$  para a determinação da real concentração desse sal em solução, ou seja, sendo desconsiderada a hidratação, onde foram obtidas as concentrações de exposição de 0,08; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0 e 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  respectivas para cada diluição.

Após aclimatação, 330 *guppies* foram distribuídos aleatoriamente em 33 aquários (10 indivíduos por aquário) divididos em subgrupos de três ( $n=3$ ) compondo assim dez grupos tratados e um grupo controle negativo (mantido em água doce artificial), sendo realizada exposição aguda, em sistema estático de aeração constante por um período de 96 horas. Sempre que observada a mortalidade dos espécimes (verificada no máximo a cada 12 horas) os peixes mortos foram removidos imediatamente dos aquários.

Na determinação da concentração de cobre letal a 50% dos espécimes expostos ( $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ ) foi utilizado o algoritmo para o software R definido por PACHECO & REBELO (2013) pois este fornece dados importantes como o intervalo de confiança, *p-value*, o valor da estatística qui-quadrado além de ser possível a determinação de parâmetros de CL não medianos (CL 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90).

### 6.6.2. Parâmetros comportamentais

A alteração do comportamento dos peixes é um importante indicador dos efeitos toxicológicos de contaminantes ambientais, sendo útil na avaliação das mudanças

comportamentais recentes como resposta a exposição aguda (UYANIKGIL et al., 2009). Para isso, as respostas comportamentais foram registradas como porcentagem de espécimes alterados durante o período de 10 minutos de avaliação, por aquário, após o período de exposição aguda (96h).

Para o cálculo da porcentagem de espécimes com alterações comportamentais foram analisados padrões reacionais como distúrbios respiratórios (natação longitudinal; disposição na superfície da água e aumento na frequência de batimento opercular), tegumentares (escurecimento das nadadeiras, escurecimento corporal, escamas eriçadas e midríase), natatórios (tremores, letargia, hiperatividade, ataxia) e sociais (canibalismo e agressividade), sendo definida a porcentagem de espécimes com alterações comportamentais em cada concentração do efluente pesqueiro avaliado.

Durante toda a exposição, foi observada a taxa de mortalidade dos espécimes machos e fêmeas expostos ao efluente pesqueiro de modo que estes foram considerados mortos somente na ausência da movimentação do opérculo associada a falta de resposta a natação após a estímulo (ARAÚJO et al., 2006).

Para o cálculo da concentração do efluente causadora de alterações comportamentais em 50% dos espécimes expostos ( $CE_{50-96h}$ ), foi utilizado o algoritmo para o *software* R definido por PACHECO & REBELO (2013) pois este fornece dados importantes como o intervalo de confiança, *p-value*, o valor da estatística qui-quadrado além de ser possível a determinação de parâmetros de CE não medianos (CE 30; 50; 70; 90).

Após exposição, todos espécimes de *P. reticulata* utilizados como modelo biológico foram eutanasiados por decapitação, segundo as orientações do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG) por meio de projeto aprovado e protocolado sob o número 046/2010.

### **6.6.3. Análise morfométrica e histoquímica**

Amostras de fígado e da porção medial do intestino delgado foram dissecadas, fixadas por um período de 24 horas em solução de paraformaldeído à 4% tamponado (pH 7,3) e acrescido de sacarose à 0,09 M, posteriormente, foram transferidas para solução de etanol 70% até o início do processamento histológico. Os tecidos fixados foram desidratados em etanol 100% (seis imersões de uma hora), diafanizados em xilol 100% (duas imersões de uma hora), infiltrados em parafina líquida pura a 56°C (duas imersões de uma hora) e inclusos em parafina também a 56°C.

Todos os cortes histológicos foram realizados com 4  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo. Para as secções de fígado empregou-se a técnica histoquímica de Perls, modificada para cobre, e para as secções da porção medial do intestino delgado foi utilizado o método histoquímico de Ferro Coloidal (Azul da Prússia) para marcação de mucinas.

Para o método de Perls os cortes foram desparafinizados em estufa a 70°C, seguido de imersões em xilol e etanol até a hidratação em água corrente, procedeu-se a coloração com solução ácida de ferrocianeto de potássio trihidratado (ferrocianeto de potássio trihidratado a 0,04M acrescido de ácido clorídrico a 0,71M na proporção de 1:1), e a contracoloração com solução acidificada de verde luz amarelado a 2,66mM (ácido acético a 0,03M) sendo posteriormente lavados em água corrente, desidratados por três imersões de etanol 100% e duas em xilol 100%.

Para o método de Azul da Prússia os cortes foram desparafinizados em estufa a 70°C, seguido de imersões em xilol e etanol até a hidratação em água corrente, acidificados por três minutos (ácido acético a 2,38M), corados por 60 minutos em solução de ferro coloidal de Muller (cloreto férrico hexahidratado a 0,53M e ácido acético a 2,18M), novamente acidificados, corados com solução ácida de ferrocianeto de potássio trihidratado (ferrocianeto de potássio trihidratado a 0,12M acrescido de HCl a 1,7M na proporção de 1:1), lavados em água corrente, contracorados com eosina amarelada e desidratados por três imersões de etanol 100% e duas em xilol 100%.

Finalmente, as lâminas foram montadas com Entellan<sup>®</sup>, observadas sob microscopia óptica com o aumento de 400x. Foram obtidas cinco fotomicrografias (campos aleatórios) por espécime sendo que as análises morfométricas intestinais foram realizadas utilizando como parâmetros a área das células caliciformes e o diâmetro das vilosidades.

#### **6.6.4. Ensaio cometa**

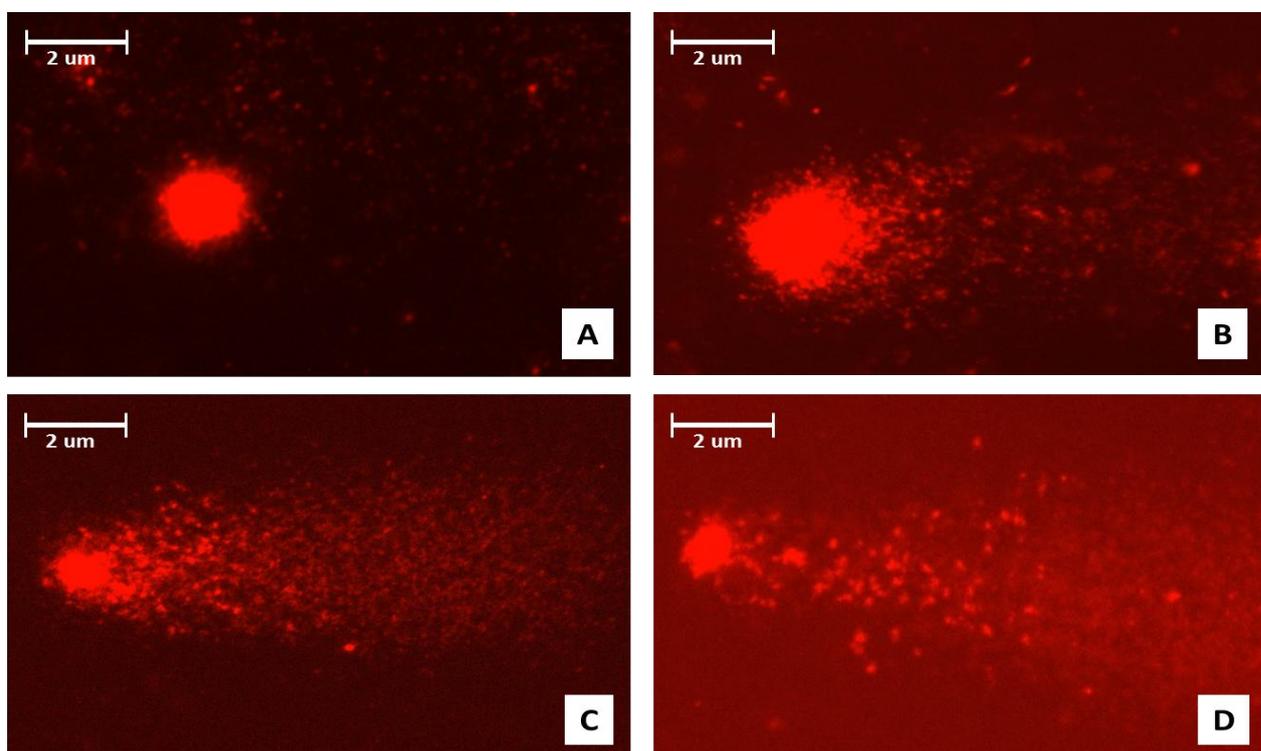
O ensaio do cometa foi realizado utilizando o método alcalino descrito por SINGH *et al.* (1988) com modificações segundo FRENZILLI *et al.* (2009). Após o período de exposição, amostras de sangue periférico foram suspensas em soro fetal bovino (1:4) e homogeneizadas em solução tamponada (PBS pH 7,4) de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5%. Posteriormente o homogeneizado foi adicionado sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%, coberto com lamínula e mantido sob refrigeração até a solidificação da agarose.

Após a solidificação do gel de agarose, as lamínulas foram removidas e as lâminas imersas solução de lise com pH 10 (NaCl a 2,22M; EDTA a 89 mM; Tris a 8,9 mM; NaOH a 0,2 M; lauril sarcosinato de sódio a 34mM; Triton X-100 a 16,53 mM e DMSO a 1,4M) sendo mantidas sob

refrigeração a 4°C durante 24 horas. Após a lise, as lâminas foram dispostas em cuba de eletroforese horizontal e acrescidas de tampão de eletroforese (NaOH a 8,69mM, EDTA 0,96mM, pH=13) para a desnaturação do DNA sendo mantidas a 4°C por 30 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada com uma corrente elétrica de 1V.cm<sup>-1</sup> a 300 mA durante 25 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,42 M, pH 7,5) em três séries de 5 minutos de cada, lavadas em água destilada, secas e fixadas em etanol absoluto.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 25 µL de solução de brometo de etídio (50µM) e cobertas com lamínula. Foram analisados 50 nucleóides por lâmina (Figura 8), totalizando 150 nucleóides por tratamento (n=3). Como controle positivo foi utilizada ciclofosfamida na concentração de 5mg.L<sup>-1</sup> (CANDIOTI *et al.* 2010; MURANLI & GÜNER, 2011). As fotomicrografias de epifluorescência foram obtidas pelo sistema de microscopia Leica DM, câmera CITOGEN ProgRes<sup>®</sup> MF Jenoptik com o auxílio do *software* LUCIA *Cytogenetics*<sup>TM</sup> com um aumento de 200x. A mensuração do dano genômico foi realizada com o parâmetro porcentagem de DNA na cauda do cometa usando o *software* CASP (*Comet Assay Software Project*, <http://casp.sourceforge.net/>) (AHMED *et al.*, 2010).



**Figura 8.** Fotomicrografias de epifluorescência de cometas e nucleóides obtidos a partir de eritrócitos de machos e fêmeas de *P. reticulata*. O ânodo é disposto à direita das fotomicrografias. De (A) até (B) é representada uma escala gradual do dano genômico observado nos eritrócitos após a realização do ensaio cometa.

### 6.6.5. Dosagem de proteína e ensaios enzimáticos

Para a extração de proteínas as amostras de fígado, após serem dissecadas e pesadas em *pool* (n=3), foram congeladas e maceradas em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0), contendo 0,25M de sacarose, sendo definida a proporção de 1 parte de fígado para cada 8 partes da solução tampão. Após completa maceração e homogeneização das amostras de fígado, o macerado bruto foi utilizado para a determinação das proteínas totais conforme descrito por Peterson (1983) com o estabelecimento de curva padrão com albumina bovina (10µg e 100 µg).

Para a determinação da atividade enzimática é necessário que se conheça os valores cinéticos correspondentes a saturação de cada enzima, assim, como não são descritas em literatura as concentrações de saturação e pH de ensaio da catalase (CAT), carboxilesterase (CarbE) e glutationa-S-transferase (GST), para *Poecilia reticulata*, foram realizados ensaios de padronização para obtenção dessas condições. Os ensaios de padronização da atividade enzimática foram realizados conforme descrito por BASTOS *et al.* (2013), posteriormente à padronização, foi realizada a avaliação da atividade específica da CAT e GST conforme descrito para *P. reticulata* por SHARBIDRE *et al.*, (2011) e da atividade da CarbE conforme descrito por (XING *et al.*, 2010), ambos com modificações.

As padronizações foram realizadas pela variação do pH e das concentrações dos substratos de cada enzima. Para a CAT foram definidos valores de pH de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 e concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 15; 25; 35; 45; 65; 85 e 100 mM. Para a CarbE os valores de pH ensaiados foram de 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0 e as concentrações do substrato p-NPA foram de 0,25; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0 mM. Para a GST a variação de pH foi de 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 sendo as concentrações de CDNB de 0,125; 0,5; 1,5; 2,5; 2,75 e 3,0 mM e as de GSH de 0,5; 1,0; 2,5; 4,0; 5,0 mM. Calculou-se a velocidade máxima de reação (V<sub>MAX</sub>) e a partir desta a concentração de substrato correspondente a constante de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>), onde K<sub>M</sub> = V<sub>MAX</sub>/2, e então definiu-se a concentração de substrato responsável pelo ótimo enzimático.

Após padronização com a definição dos valores de pH e concentração de substrato ótimos para o ensaio enzimático, prosseguiu-se com avaliação da atividade enzimática da CAT, CarbE e GST nos espécimes machos e fêmeas tratados com o efluente pesqueiro de seca e chuva e com a CL<sub>50-96h</sub> do cobre iônico (Cu<sup>2+</sup>).

Na determinação da atividade da CAT, foi registrado o consumo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) baseado no decréscimo da absorbância a 240 nm. Alíquotas de 2 µL do macerado bruto diluído (na proporção de uma parte de macerado para 19 partes de tampão fosfato de potássio a 0,1M e pH 7,0) foram acrescentadas ao meio de reação constituído por 370,5 µL de

tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 5,83), 12,5 µL de EDTA (40mM) e de 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 2,66M de modo que a concentração final do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio reacional foi de 100mM. A atividade da CAT foi expressa pelo valor modular em µmol.min<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por µg de proteína.

Para a determinação da atividade da CarBE foi registrada a formação de 4-nitrofenol (PNF) pela hidrólise do 4-nitrofenil acetato (p-NPA) determinado pelo aumento da absorbância lida no comprimento de onda de 400nm. Alíquotas de 1 µL do macerado bruto foram acrescidas ao meio reacional constituído por 384 µL de tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 8,33), 15 µL de p-NPA a 234,4mM (diluído em etanol) de modo que a concentração final desse substrato foi de 8,79mM. A atividade da CarBE foi expressa em µmol.min<sup>-1</sup> de PNF por µg de proteína.

Na avaliação da atividade da GST foi registrada a formação do conjugado da glutatona reduzida com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (GS-DNB) determinado pelo aumento da absorbância observada no comprimento de onda de 340nm. Alíquotas de 1 µL do macerado bruto foram acrescidas ao meio de reação constituído por 364 µL de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,0), 15 µL de CDNB (416,66mM) e de 20 µL de GSH a 166,8mM de modo que a concentração final dos substratos CDNB e GSH no meio reacional foi de 15,625mM e 8,34mM respectivamente. A atividade da GST foi expressa em µmol.min<sup>-1</sup> de DNB-GS por µg de proteína.

As leituras de absorvância foram realizadas a cada dez segundos (6x), totalizando um minuto de reação, em espectrofotômetro da marca HACH (DR 500) em modo de operação cinético. Para a dosagem de proteínas foram utilizadas cubetas de poliestireno e para os ensaios enzimáticos foram utilizadas cubetas de quartzo, ambas com o caminho óptico de 1cm. Para o cálculo da atividade enzimática foram utilizados os coeficientes de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon_{240} = 43600\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), PNF ( $\epsilon_{400} = 13000\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e GS-DNB ( $\epsilon_{340} = 9600\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

## 6.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Software, Inc.) e o software R v3.0.1 (R Software, Inc). Segundo Callegari-Jacques (2007) quando as pressuposições de normalidade e homocedasticidade não são atendidas não se deve realizar uma análise de variância tradicional (ANOVA) pois a probabilidade de cometer o erro do Tipo I torna-se maior, nesse caso, o teste de Kuskal-Wallis é referido como uma alternativa não-paramétrica para a ANOVA de um critério.

Assim, quando os requisitos de normalidade e homocedasticidade não foram satisfeitos (testados utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Bartlett respectivamente), testes não paramétricos equivalentes foram usados (Kruskal-Wallis). Os testes Tukey e Dunn foram usados sempre que a

ANOVA ou o Kruskal-Wallis, respectivamente, detectaram a existência de diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de significância ( $\alpha$ ) de 5%.

## 7. Resultados

Segundo a resolução número 357 do conselho nacional do meio ambiente (CONAMA) as águas do pesqueiro Jaó são enquadradas na classe 2, por serem destinadas a atividades de pesca e a balneabilidade. Corpos hídricos dessa classe podem ser destinados ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais a população possa vir a ter contato direto; à aquicultura e à atividade de pesca (CONAMA, 2005).

Como ferramenta de validação dos experimentos realizados, tendo em vista as condições de manutenção e aclimatação da espécie *P. reticulata*, a porcentagem de sobrevivência no grupo controle foi superior a 90%, no período de seca e de chuva, permanecendo dentro dos limites definidos para os testes de toxicidade aguda segundo a normatização nº 203 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992).

### 7.1. Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e orgânicos

Para os resultados das análises físico-químicas, os valores de pH, temperatura, turbidez, oxigênio dissolvido (OD) e sólidos totais dissolvidos (STD), tanto para a amostragem realizada no período de seca quanto no período de chuva, apresentaram resultados dentro dos valores máximos permitidos pelas resoluções nº 357 e nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005 e 2011). Os resultados obtidos para condutividade das águas do pesqueiro no período de seca ( $0,027 \text{ mS.cm}^{-1}$ ) e no período de chuva ( $0,028 \text{ mS.cm}^{-1}$ ) não apresentaram variação significativa e não possuem limites máximos ou mínimos definidos pelas resoluções brasileiras.

Após quantificação dos parâmetros inorgânicos, no período de seca, foram encontradas altas concentrações de cobre ( $0,013 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e fósforo ( $0,80 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em relação ao limite máximo ( $0,009$  e  $0,020 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente) permitido pelas resoluções nº 357 e nº 430 (CONAMA, 2005 e 2011). A concentração de nitrogênio total ( $0,76 \text{ mg.L}^{-1}$ ) permaneceu abaixo do limite ( $1,27 \text{ mg.L}^{-1}$ ) definido pela resolução nº 430 (que dispõe sobre os efluentes) não sendo estabelecida uma concentração máxima desse composto segundo resolução que dispõe sobre os pesqueiros, sendo esse mesmo resultado encontrado para o nitrito, nitrato e cloretos totais (Tabela 3).

No período de chuva, concentrações ainda maiores foram determinadas para o cobre (1,709 mg.L<sup>-1</sup>) correspondendo a um aumento de aproximadamente 13000% dessa concentração em relação ao período de seca (Tabela 3). Também foi observada alta concentração de fósforo (0,38 mg.L<sup>-1</sup>), que foi superior ao limite definido pela resolução n° 357 (0,020 mg.L<sup>-1</sup>) e pela resolução 430 (0,030 mg.L<sup>-1</sup>), sendo esta característica comum de ambientes em processo de eutrofização.

**Tabela 3** - Valores da aferição de parâmetros físico-químicos, inorgânicos, orgânicos, realizados no pesqueiro do lago artificial do Jaó em período de seca e chuva de 2014.

Parâmetros	Seca	Chuva	Res. (n°357)*	Res. (n°430)**
<i>P.F.Q.</i>				
pH	7,99	8,61	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0
Temperatura	24,24 °C	28,69 °C	> 40 °C	Nd
Condutividade	0,027 mS.cm <sup>-1</sup>	0,028 mS.cm <sup>-1</sup>	Nd	Nd
Turbidez	54,1 NTU	48 NTU	< 100 NTU	< 100 NTU
OD	13,09 mg.L <sup>-1</sup>	11,13 mg.L <sup>-1</sup>	> 5 mg.L <sup>-1</sup>	> 5mg.L <sup>-1</sup>
STD	0,017 g.L <sup>-1</sup>	0,018 g.L <sup>-1</sup>	< 0,5 g.L <sup>-1</sup>	< 0,5 g.L <sup>-1</sup>
<i>P.I.</i>				
Nitrito	< 0,01 mg.L <sup>-1</sup>	< 0,01 mg.L <sup>-1</sup>	< 1 mg.L <sup>-1</sup>	< 1 mg.L <sup>-1</sup>
Nitrato	0,2 mg.L <sup>-1</sup>	0,7 mg.L <sup>-1</sup>	< 10 mg.L <sup>-1</sup>	< 10 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Cobre (Algicida)</b>	<b>0,013<sup>a</sup> mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>1,709<sup>a</sup> mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>&lt; 0,009 mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>&lt; 0,009 mg.L<sup>-1</sup></b>
Cloreto (Algicida)	2,4 mg.L <sup>-1</sup>	1,4 mg.L <sup>-1</sup>	< 250 mg.L <sup>-1</sup>	< 250 mg.L <sup>-1</sup>
<b>Nitrogênio</b>	<b>0,76 mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>1,82<sup>a</sup> mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>Nd</b>	<b>&lt; 1,27 mg.L<sup>-1</sup></b>
<b>Fósforo</b>	<b>0,80<sup>a</sup> mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>0,38<sup>a</sup> mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>&lt; 0,020 mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>&lt; 0,030 mg.L<sup>-1</sup></b>
<i>P.O.</i>				
Clorofila a	< 1,0 µg.L <sup>-1</sup>	< 1,0 µg.L <sup>-1</sup>	< 30 µg.L <sup>-1</sup>	< 30 µg.L <sup>-1</sup>
Paration	< 0,01 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,01 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,04 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,04 µg.L <sup>-1</sup>
Glifosato	< 0,01 mg.L <sup>-1</sup>	< 0,01 mg.L <sup>-1</sup>	< 0,065 mg.L <sup>-1</sup>	< 0,065 mg.L <sup>-1</sup>
2,4 – D	< 0,01 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,01 µg.L <sup>-1</sup>	< 4 µg.L <sup>-1</sup>	Nd
Benzo(a)pireno	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,018 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,05 µg.L <sup>-1</sup>
Benzo(b)fluoranteno	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,018 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,05 µg.L <sup>-1</sup>
Indeno(1,2,3,cd)pireno	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,018 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,05 µg.L <sup>-1</sup>
Dibenzo(a,h)antraceno	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,001 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,018 µg.L <sup>-1</sup>	< 0,05 µg.L <sup>-1</sup>

\*Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento; \*\*Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Parâmetros seguidos de letra “a” indicam concentrações acima do preconizado pela resolução n° 357 do CONAMA. Nd = Não definido. P.F.Q. = Parâmetros Físico-Químicos. P.I. = Parâmetros Inorgânicos. P.O. = Parâmetros Orgânicos.

Também não foram encontradas altas concentrações do pesticida paration (O,O-dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato) e dos herbicidas glifosato (N-fosfometil-glicina) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético) de modo que esses valores permaneceram abaixo do limite máximo definido pelas normatizações brasileiras (CONAMA, 2005, 2011), tanto para o despejo de efluentes, quanto para a manutenção de corpos hídricos como os pesqueiros. Os mesmos resultados foram obtidos após a quantificação de clorofila a de modo que esta se apresentou em concentrações inferiores a  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  para dos dois períodos amostrados.

Quanto aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), tanto para as águas coletadas no período de seca quanto o de chuva, não foram encontradas altas concentrações de benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno(1,2,3,cd)pireno e dibenzo(a,h)antraceno, de modo que esses HPAs se encontram dentro do limite máximo permitido pela resolução n°357 (dispõem sobre pesqueiros) e n° 430 (dispõem sobre efluentes) do CONAMA.

Como foi observada uma contaminação por cobre, tanto no período de seca quanto de chuva, foi calculada a concentração letal média ( $CL_{50-96h}$ ) do  $\text{CuSO}_4$  para os espécimes de *P. reticulata* expostos por um período de 96 horas onde foram obtidos os valores de  $CL_{50-96h}$  de  $0,82 \pm 0,17 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo essa exposição adicionada nas avaliações e comparações histopatológicas, genotoxicológicas e enzimáticas.

## 7.2. Análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton

Foram encontrados 29 táxons de algas distribuídos entre os filos Cyanobacteria, Chlorophyta, Cryptophyta, Carophyta e Bacillariophyta. As cianobactérias apresentaram maior ocorrência dentre as algas fitoplanctônicas amostradas ocorrendo o predomínio dos gêneros *Anabaena* (28,57%), *Monoraphidium* (13,13%) e *Synechocystis* (10,62%). Para o gênero *Microcystis*, comumente referido como o maior produtor de microcistinas, foram identificadas três espécies correspondendo a 4,45% de indivíduos contabilizados por mL de amostra (Tabela 4).

**Tabela 4.** Espécies de algas planctônicas dos filos Cyanobacteria, Chlorophyta, Cryptophyta, Carophyta e Bacillariophyta identificadas no lago artificial do Clube de Pesca Jaó.

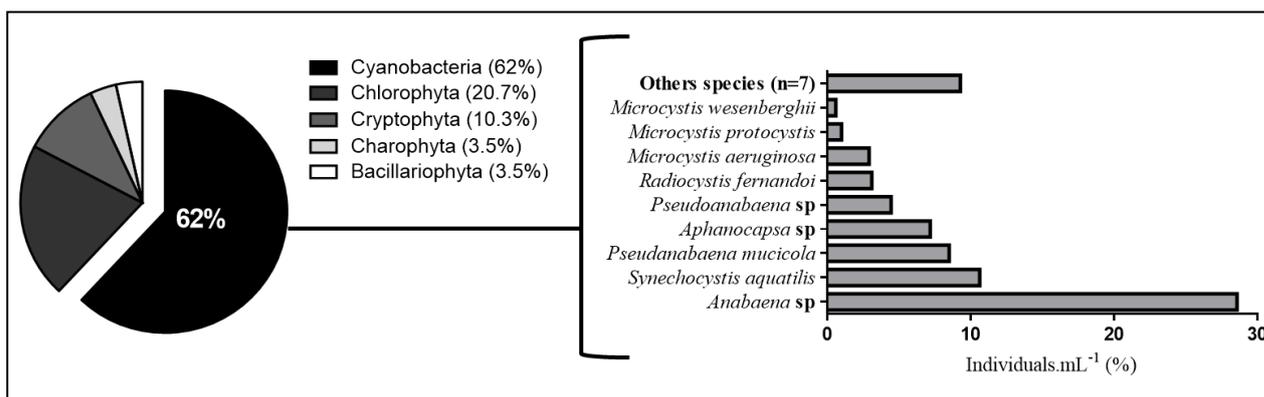
Filo Cyanobacteria	Ind.mL <sup>-1</sup> (%)
<i>Anabaena</i> sp	28,57
<i>Aphanocapsa elachista</i> West & G.S. West (1894)	0,58
<i>Aphanocapsa</i> sp	6,58
<i>Chroococcus planctonicus</i> Bethge (1935)	0,19
<i>Chroococcus</i> sp	0,39

*Continua*

Continuação

<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya, G. & Subba Raju, N. (1972)	1,74
<i>Dolichospermum circinale</i> (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) P.Wacklin, L.Hoffmann & J.Komárek (2009)	1,16
<i>Dolichospermum planctonicum</i> (Brunnthaler) Wacklin, L.Hoffmann & Komárek (2009)	1,54
<i>Microcystis aeruginosa</i> Kützing (1846)	2,90
<i>Microcystis protocystis</i> Crow (1923)	0,97
<i>Microcystis wesenbergii</i> Joosten (2006)	0,58
<i>Phormidium</i> sp	2,32
<i>Pseudanabaena mucicola</i> (Naumann & Huber-Pestalozzi) Schwabe (1964)	9,49
<i>Pseudoanabaena</i> sp	4,44
<i>Radiocystis fernandoi</i> Komárek, J. & Komárková-Legnerová, J. (1993)	3,09
<i>Synechococcus</i> sp	1,93
<i>Synechocystis aquatilis</i> Geitler (1935)	10,62
<b>Filo Chlorophyta</b>	
<i>Coelastrum proboscideum</i> (Bohlin) Wittrock, Nordstedt & Lagerheim (1896)	0,39
<i>Desmodesmus communis</i> Hegewald (2000)	0,77
<i>Desmodesmus intermedius</i> (Chodat) E.Hegewald (2000)	0,39
<i>Micractinium pusillum</i> Fresenius (1858)	0,19
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová (1969)	13,13
<i>Raphidocelis</i> sp	1,16
<b>Filo Cryptophyta</b>	
<i>Cryptomonas erosa</i> Ehrenberg (1832)	0,77
<i>Cryptomonas marsonii</i> Skuja (1948)	0,19
<i>Cryptomonas obovata</i> Skuja (1948)	0,39
<b>Filo Charophyta</b>	
<i>Staurastrum leptocladum</i> Nordstedt (1870)	0,19
<b>Filo Bacillariophyta</b>	
<i>Nitzschia</i> sp	0,19

A espécie *Microcystis aeruginosa* (Figura 10A), a mais estudada quanto a produção de cianotoxinas (MCYSTs), apresentou baixa densidade populacional (1.588 indivíduos.mL<sup>-1</sup>) correspondendo a 2,9% de toda a comunidade fitoplanctônica, entretanto, o gênero *Anabaena* que também possui espécies produtoras de MCYSTs foi caracterizado como de alta densidade populacional (15.170 indivíduos.mL<sup>-1</sup>) correspondendo a um total de 28,57% de todo o fitoplâncton amostrado (Figura 9).



**Figura 9.** Densidade populacional de diferentes táxons de algas coletadas no lago artificial do pesqueiro Jaó.

Os espécimes do gênero *Anabaena* que foram amostrados, são caracterizados morfologicamente pela presença, em sua maioria, de um acineto e um heterócito por filamento (Figura 10B), sendo os acinetos também denominados esporos de resistência por serem encontrados em populações senescentes.



**Figura 10.** Principais gêneros produtores de microcistina encontrados em amostras de fitoplâncton coletadas no lago artificial pesqueiro do Jaó. (A) a seta preta indica uma colônia irregular de *Microcystis* sp evidenciando mucilagem conspícua envolvendo a colônia. (B) filamento simples de *Anabaena* sp caracterizado pela presença de heterócito (seta) e acineto (cabeça de seta) ao longo do filamento.

### 7.3. Caracterização da microcistina L-R por HPLC

Em análise do cromatograma gerado após a injeção da fração extraída das amostras de água bruta e do concentrado de algas, tanto para o período de seca quanto para o período de

chuva, não foram observados picos que permitissem a caracterização da presença de microcistina L-R (MCYST-LR) nessas amostras. Assim, não foi observada contaminação por MCYST-LR no pesqueiro após análise das águas pelo método de HPLC.

#### 7.4. Bioensaios para avaliação da toxicidade do efluente

Quando avaliada a taxa de mortalidade, o efluente pesqueiro estudado não foi letal para os espécimes de *Poecilia reticulata*. Assim, não foram registradas mortalidades, de machos e fêmeas, de *P. reticulata* expostos as concentrações de 25, 50, 75 e 100% do efluente pesqueiro do período de seca e de chuva, após o período de 96 horas de exposição, sendo possível inferir um provável efeito subletal associado as amostras de águas eutróficas coletadas.

##### 7.4.1. Concentração letal do cobre (Cu<sup>2+</sup>)

A CL<sub>50</sub> (96h) determinada para o CuSO<sub>4</sub> em *P. reticulata* foi de 0,82±0,16mg.L<sup>-1</sup>, observou-se ainda a CL<sub>30</sub> (0,3mg.L<sup>-1</sup>), CL<sub>40</sub> (0,57mg.L<sup>-1</sup>), CL<sub>60</sub> (1,08mg.L<sup>-1</sup>), CL<sub>70</sub> (1,35mg.L<sup>-1</sup>), CL<sub>80</sub> (1,67mg.L<sup>-1</sup>) e CL<sub>90</sub> (2,11mg.L<sup>-1</sup>) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Toxicidade aguda (96h) do Cu<sup>2+</sup> determinada pela concentração letal (CL) em machos e fêmeas de guppies (*Poecilia reticulata*)

CL	Cu <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	IC (95%)	χ <sup>2</sup>	p-valor
CL 30	0,30	0,05 - 0,51	47,26	p<0,05
CL 40	0,57	0,38 - 0,75	47,26	p<0,05
<b>CL 50</b>	<b>0,82</b>	<b>0,66 - 0,99</b>	<b>47,26</b>	<b>p&lt;0,05</b>
CL 60	1,08	0,92 - 1,25	47,26	p<0,05
CL 70	1,35	1,18 - 1,54	47,26	p<0,05
CL 80	1,67	1,46 - 1,92	47,26	p<0,05
CL 90	2,11	1,85 - 2,51	47,26	p<0,05

IC = Intervalo de confiança

É descrito em literatura que a CL<sub>50-96h</sub> do cobre, em águas moderadamente duras, para o *P. reticulata* é de 0,08 mg.L<sup>-1</sup> (BERTOLETTI, 2009), entretanto, nesse estudo, foram encontrados resultados de toxicidade distintos dos já descritos, sendo a CL<sub>50-96h</sub> para o cobre (como CuSO<sub>4</sub>) de 0,82 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 4). Ressalta-se a possibilidade de que a CL<sub>50-96h</sub> para o cobre descrita para *P. reticulata* foi calculada a partir do sulfato de cobre em sua formulação pentahidratada (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) ao invés da formulação anidra (CuSO<sub>4</sub>), o que altera significativamente o valor da concentração letal média.

### 7.4.2. Parâmetros comportamentais

Várias alterações comportamentais foram observadas nos espécimes, dentre elas as mais frequentes foram as alterações tegumentares do tipo retração da nadadeira caudal, escurecimento corpóreo, e midríase. Também foram observadas alterações comportamentais respiratórias como a disposição dos espécimes sobre superfície da água e perda de orientação horizontal na água. Os espécimes machos mostraram-se mais susceptíveis as alterações comportamentais que as fêmeas, tanto no período de seca quanto no período de chuva, o que demonstra uma maior sensibilidade desses organismos às repostas comportamentais quando expostos a águas contaminadas/efluentes como o avaliado nesse estudo.

No período de seca a  $CE_{50-96h}$  para machos foi de  $60,48 \pm 11,15\%$  e para fêmeas de  $85,08 \pm 14,92\%$ , entretanto, na exposição referente ao período de chuva houve uma maior toxicidade do efluente pois esse, em concentrações menores, também promoveu alterações comportamentais em 50% dos indivíduos expostos sendo a  $CE_{50-96h}$  para os machos ( $32,29 \pm 7,28\%$ ) e para fêmeas ( $49,50 \pm 10,45$ ) inferiores a observada no período de seca (Tabela 6).

**Tabela 6.** Toxicidade aguda (96h) do efluente pesqueiro, no período de seca e de chuva, determinada pela concentração efetiva (CE) causadora de disfunções etológicas em machos e fêmeas de guppies (*Poecilia reticulata*).

	Seca					Chuva				
	CE	[%]	IC (95%)	$\chi^2$	p-valor	CE	[%]	IC (95%)	$\chi^2$	p-valor
Macho	CE 30	30,11	16,14 - 42,49	12,86	<0,05	CE 30	15,01	4,98 - 23,63	9,52	<0,05
	CE 40	45,81	34,45 - 56,63	12,86	<0,05	CE 40	23,94	15,68 - 31,71	9,52	<0,05
	<b>CE 50</b>	<b>60,48</b>	<b>49,33 - 71,63</b>	<b>12,86</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>CE 50</b>	<b>32,29</b>	<b>25,01 - 39,58</b>	<b>9,52</b>	<b>&lt;0,05</b>
	CE 60	75,16	62,42 - 88,66	12,86	<0,05	CE 60	40,64	33,72 - 47,96	9,52	<0,05
	CE 70	90,86	75,43 - 100,00	12,86	<0,05	CE 70	49,57	42,42 - 57,67	9,52	<0,05
Fêmea	CE 30	37,65	18,18 - 55,13	12,93	<0,05	CE 30	20,27	5,23 - 33,42	10,25	<0,05
	CE 40	62,17	44,60 - 78,90	12,93	<0,05	CE 40	35,38	23,68 - 46,49	10,25	<0,05
	<b>CE 50</b>	<b>85,08</b>	<b>62,51 - 100</b>	<b>12,93</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>CE 50</b>	<b>49,50</b>	<b>39,05 - 59,95</b>	<b>10,25</b>	<b>&lt;0,05</b>
	CE 60	Nd	Nd	Nd	Nd	CE 60	63,63	52,60 - 75,24	10,25	<0,05
	CE 70	Nd	Nd	Nd	Nd	CE 70	78,73	65,72 - 93,60	10,25	<0,05

IC = Intervalo de confiança

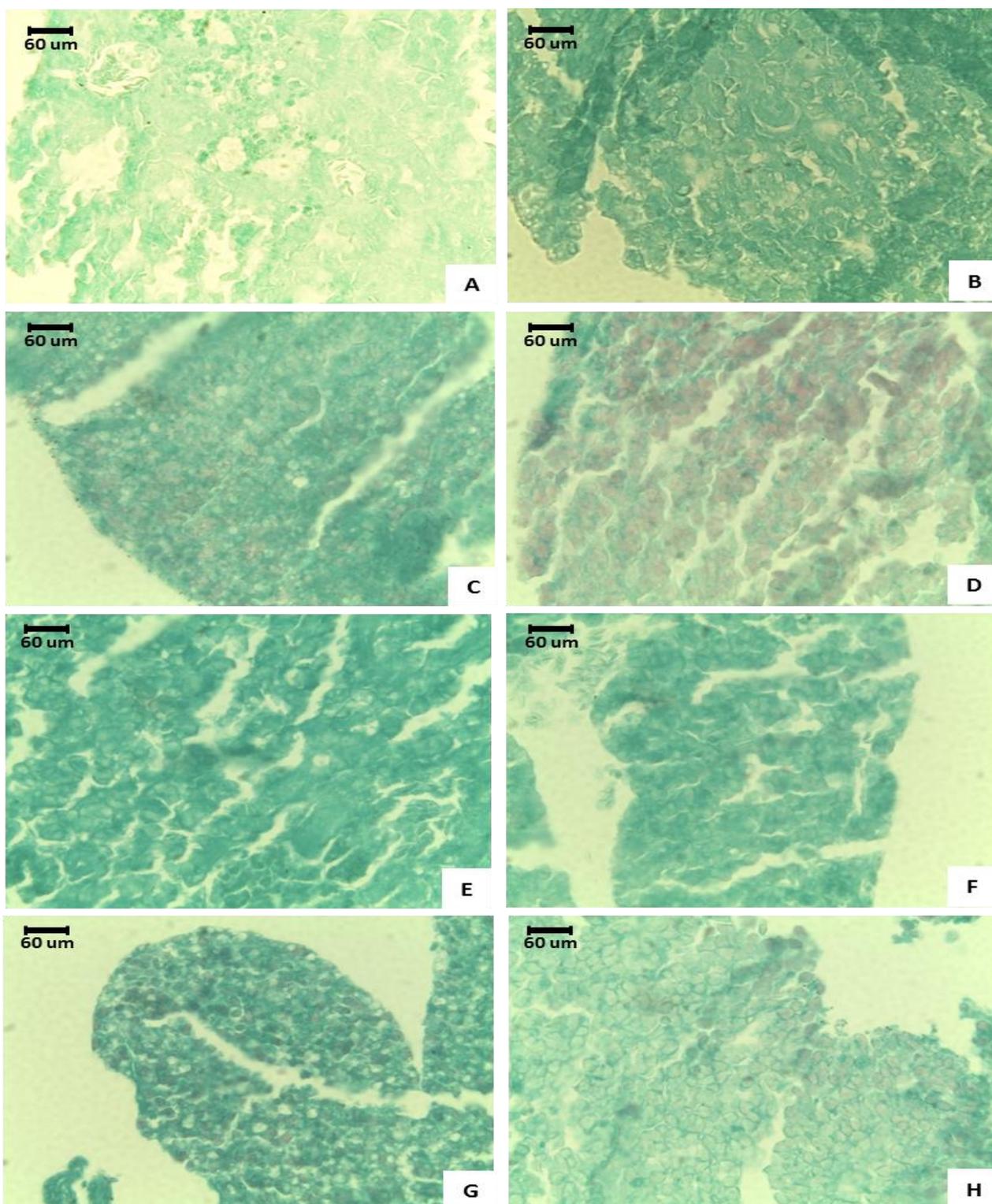
Do total de espécimes expostos ao efluente bruto do período de seca aproximadamente 70% dos guppies machos apresentaram algum tipo de alteração comportamental, enquanto que em fêmeas essas alterações ocorreram em aproximadamente 50% dos espécimes. Para o período de chuva o efluente bruto foi responsável pelas alterações comportamentais em aproximadamente

90% dos espécimes machos sendo em que em fêmeas essas disfunções ocorreram em pouco mais que 70% dos espécimes expostos.

A concentração do efluente pesqueiro, do período de seca, que causou uma menor frequência (<30%) de alterações comportamentais nos espécimes de guppies foi de, aproximadamente, 16% para machos e 18% para fêmeas. Já para o período de chuva, a concentração mínima do efluente responsável por causar menos de 30% das alterações comportamentais foi de aproximadamente 5% para machos e fêmeas.

#### **7.4.3. Análise morfométrica e histoquímica**

Após a análise do parênquima hepático dos espécimes machos e fêmeas de *P. reticulata* expostos ao efluente pesqueiro foram identificados depósitos intracelulares de  $\text{Cu}^{2+}$  (marcados de vermelho pelo método histoquímico de Perls), tanto para os espécimes expostos no período de seca quanto os expostos no período chuvoso. Foi encontrada uma maior distribuição desse metal sobre o fígado de fêmeas, principalmente, as expostas ao efluente pesqueiro do período chuvoso (Figura 11, H).



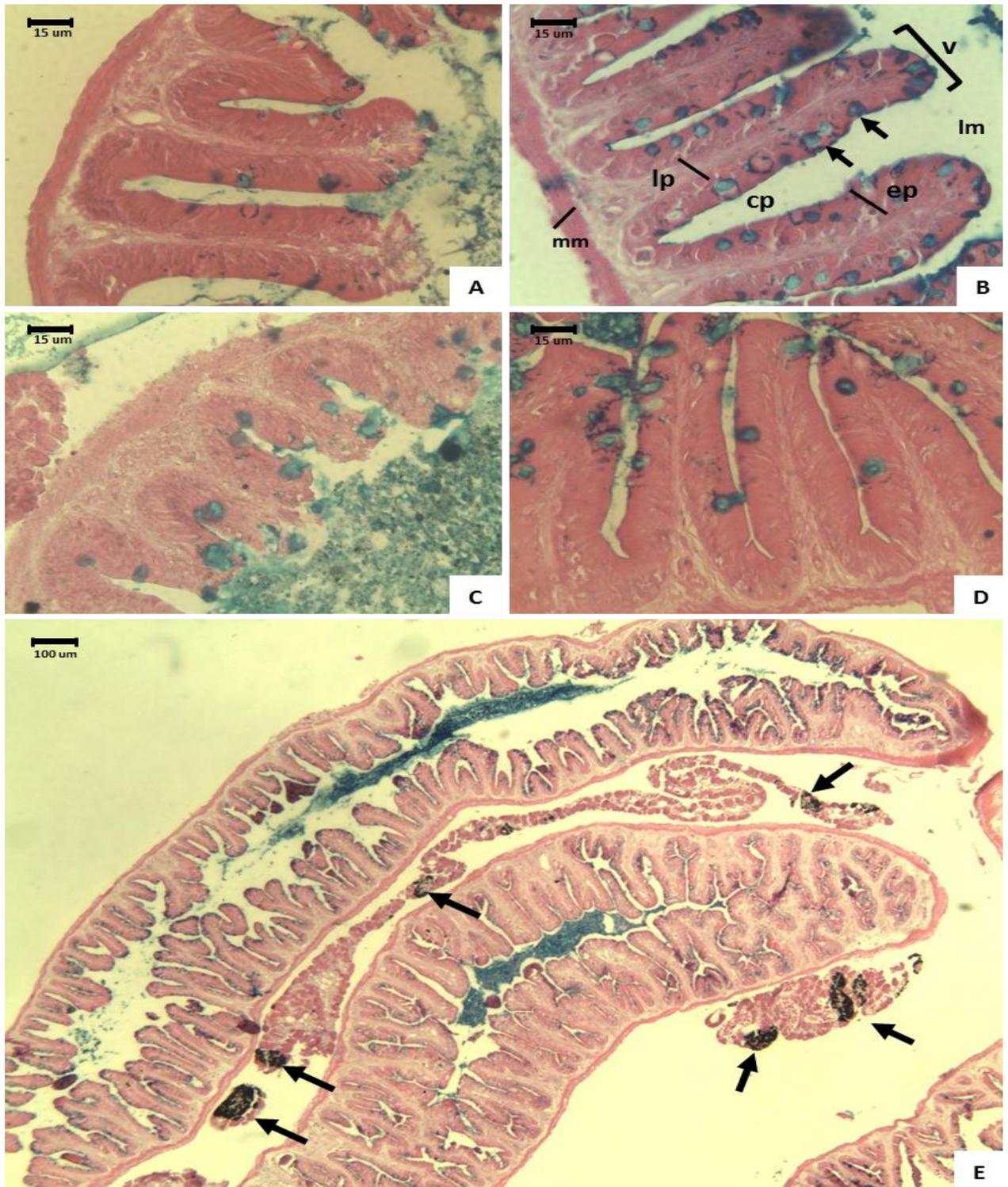
**Figura 11.** Fotomicrografias de tecido hepático de *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$  (Coloração pelo método de Perls para cobre, com modificações). Imagens à esquerda correspondem ao fígado de machos e a direita de fêmeas. (A) e (B) grupo controle sem deposição de  $Cu^{2+}$ ; (C) e (D) grupo tratado com  $Cu^{2+}$  mostra intensa deposição de íons cúpricos no citoplasma dos hepatócitos, sendo as fêmeas caracterizadas pelo maior acúmulo desses íons;

*Continua*

(E) e (F) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de seca apresentando pouca deposição de  $\text{Cu}^{2+}$  nos hepatócitos, tanto nos espécimes machos quanto nas fêmeas; (G) e (H) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de chuva apresenta maior deposição de cobre nos hepatócitos, em relação à seca, sendo esse aspecto caracterizado pela coloração avermelhada dessas células em todo o tecido hepático.

Nos espécimes expostos ao efluente pesqueiro, principalmente do período chuvoso, as lesões histopatológicas mais encontradas na porção medial do intestino delgado foram os centros de melanomacrófagos circunscritos por tecido capsular aparentemente fibroso (Figura 12, D). Todos os centros de melanomacrófagos encontrados apresentaram disposição externa à serosa intestinal sem nenhuma distribuição regular.

As superfícies das vilosidades intestinais apresentaram grande deposição de mucina que pode ser identificada pela coloração azul escuro, corada pela técnica de azul da prússia, sobre o epitélio intestinal (Figura 12, D e E). Foi observado um aumento na área das células calciformes, tanto em machos quanto em fêmeas de *P. reticulata*, fato este que pode ser associado a uma maior produção de mucinas intestinais.



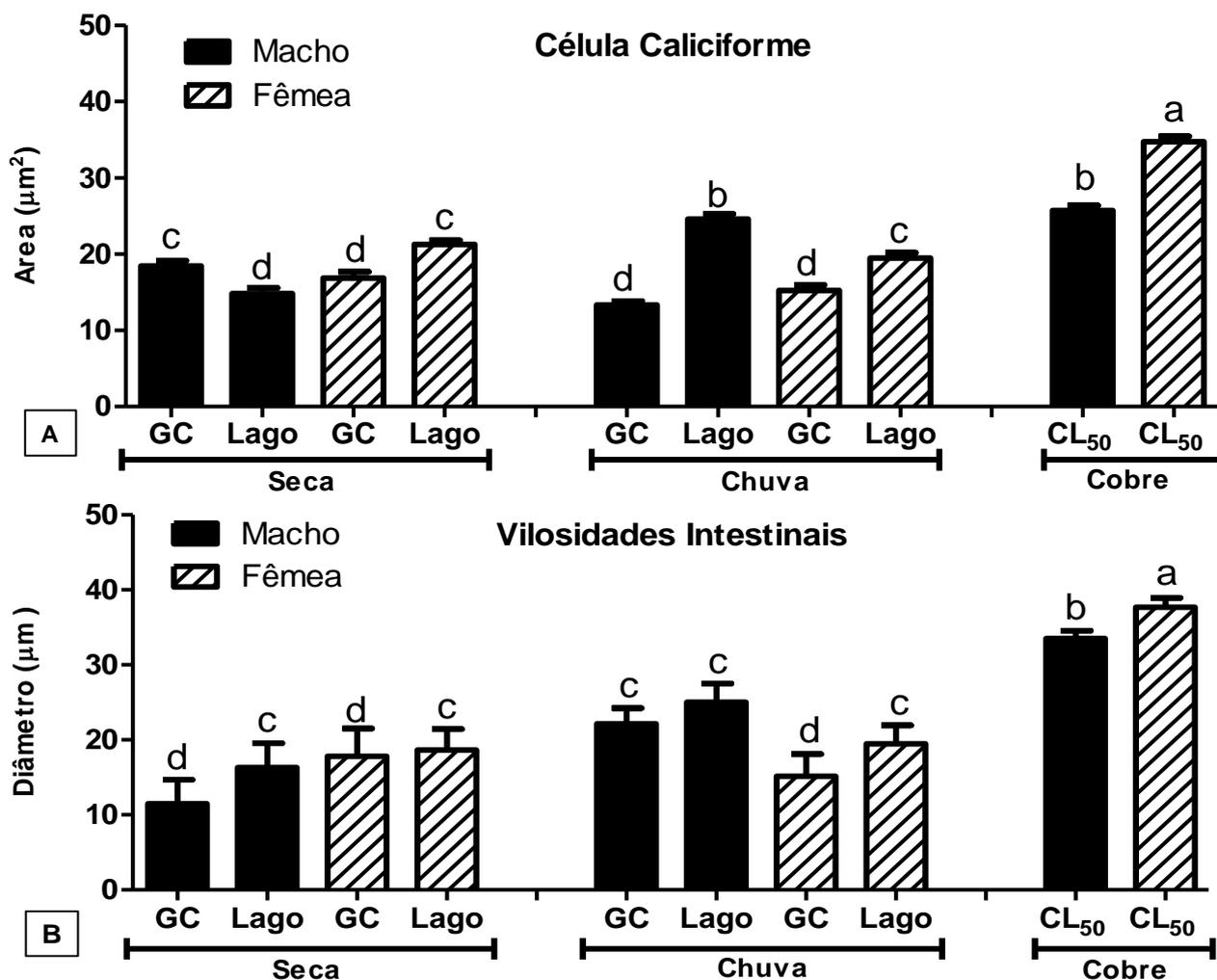
**Figura 12.** Fotomicrografias de perfis histopatológicos na porção medial do intestinal delgado de *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$  (Coloração pelo método de Ferro Coloidal). (A) grupo controle mostra citoarquitetura e disposição normal das vilosidades (corte transversal); (B) grupo tratado com  $Cu^{2+}$  apresenta vilosidades com deposição de mucina, células caliciformes com maior área e em grande número (setas pretas) (corte transversal).

*Continua*

(C) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de seca e (D) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de chuva, ambos, apresentam intestino com numerosas células caliciformes em processo de lise para deposição de mucina, assim como maior diâmetro das vilosidades e maior área das células caliciformes (corte transversal); (E) grupo tratado com efluente pesqueiro do período de chuva apresenta seções intestinais distintas com número variável de células caliciformes e deposição de mucina na luz intestinal e centros de melanomacrófagos (setas pretas) (corte longitudinal). mm: muscular mucosa; pl: lâmina própria; cp: cripta; ep: epitélio; lm: lúmen; v: vilosidade.

Quando expostos ao efluente pesqueiro do período de seca os espécimes machos apresentaram células caliciformes com área de  $14,82 \pm 0,73 \mu\text{m}^2$  sendo esse valor inferior ( $p < 0,05$ ) ao observado no grupo controle para esse período ( $18,41 \pm 0,73 \mu\text{m}^2$ ). Para esse mesmo período as fêmeas expostas ao efluente apresentaram células caliciformes com área de  $21,74 \pm 0,53 \mu\text{m}^2$  sendo esse valor superior ( $p < 0,05$ ) ao observado no grupo controle para esse período ( $17,24 \pm 0,83 \mu\text{m}^2$ ).

Quando os espécimes machos e fêmeas foram expostos ao efluente coletado no período chuvoso, ambos apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na área das células caliciformes ( $24,57 \pm 0,58 \mu\text{m}^2$  e  $19,90 \pm 0,74 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 13, A). Ao se comparar a área das células caliciformes dos espécimes machos e fêmeas expostos à  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  do  $\text{Cu}^{2+}$  (como  $\text{CuSO}_4$ ) observou-se um aumento da área desse tipo celular em fêmeas do que em machos. Adicionalmente, pode-se observar que os espécimes machos expostos à  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  do  $\text{Cu}^{2+}$  apresentaram o mesmo aumento na área das células caliciformes quando comparados aos expostos ao efluente pesqueiro do período chuvoso ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13.** Morfometria intestinal de machos e fêmeas de *P. reticulata* sob exposição aguda ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e chuva (2014) e à  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . (A) Área das células caliciformes como parâmetro morfométrico da porção medial do intestino delgado. (B) Diâmetro das vilosidades intestinais como parâmetro morfométrico da porção medial do intestino delgado. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e controles ( $p < 0,05$ ).

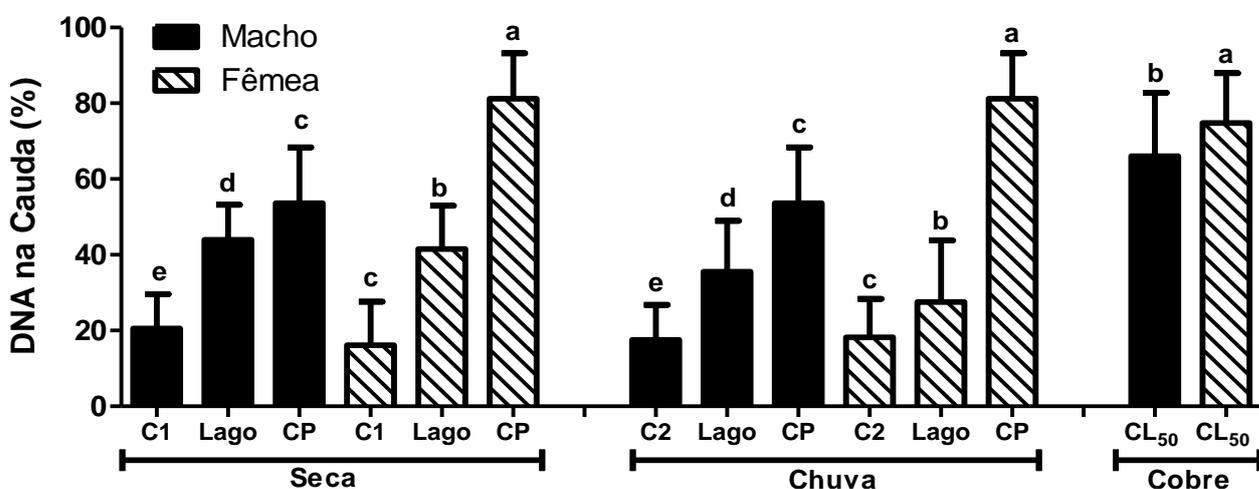
Foi observado um aumento no diâmetro das vilosidades intestinais, tanto em machos quanto em fêmeas de *P. reticulata*, fato este que pode ser relacionado ao aumento na produção de mucinas caracterizado pela maior área das células caliciformes. Quando os espécimes machos e fêmeas foram expostos ao efluente coletado no período de seca, ambos apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) no diâmetro das vilosidades intestinais ( $16,30 \pm 3,25 \mu\text{m}$  e  $18,63 \pm 2,80 \mu\text{m}$ , respectivamente) quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 13, B).

Quando expostos ao efluente pesqueiro do período de chuva os espécimes machos apresentaram vilosidade com diâmetro de  $25,03 \pm 2,48 \mu\text{m}$  não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao diâmetro observado no grupo controle para esse período ( $22,16 \pm 2,07$

$\mu\text{m}$ ). Para esse mesmo período as fêmeas expostas ao efluente apresentaram vilosidades com diâmetro de  $19,47 \pm 2,46 \mu\text{m}$  sendo esse valor superior ( $p < 0,05$ ) ao observado no grupo controle para esse período ( $15,13 \pm 2,99 \mu\text{m}$ ). Ao se comparar o diâmetro das vilosidades dos espécimes machos e fêmeas expostos à  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  do  $\text{Cu}^{2+}$  (como  $\text{CuSO}_4$ ) observou-se que as fêmeas apresentaram suas vilosidades com maior diâmetro quando comparadas aos machos de sua espécie. Pode-se observar que os espécimes machos expostos à  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  do  $\text{Cu}^{2+}$  apresentaram maior aumento no diâmetro das vilosidades quando comparados aos expostos ao efluente pesqueiro do período de seca e de chuva ( $p > 0,05$ ).

#### 7.4.4. Ensaio cometa

Após a realização do ensaio cometa em eritrócitos de machos e fêmeas de *P. reticulata* expostos ao efluente pesqueiro dos períodos de seca e de chuva, foi observado o efeito genotóxico da exposição aguda (96h) a esse efluente (Figura 14), de modo que tanto os espécimes machos quanto as fêmeas apresentaram um aumento da genotoxicidade, para ambos os períodos avaliados, determinado pelo parâmetro de porcentagem de DNA na cauda do cometa.

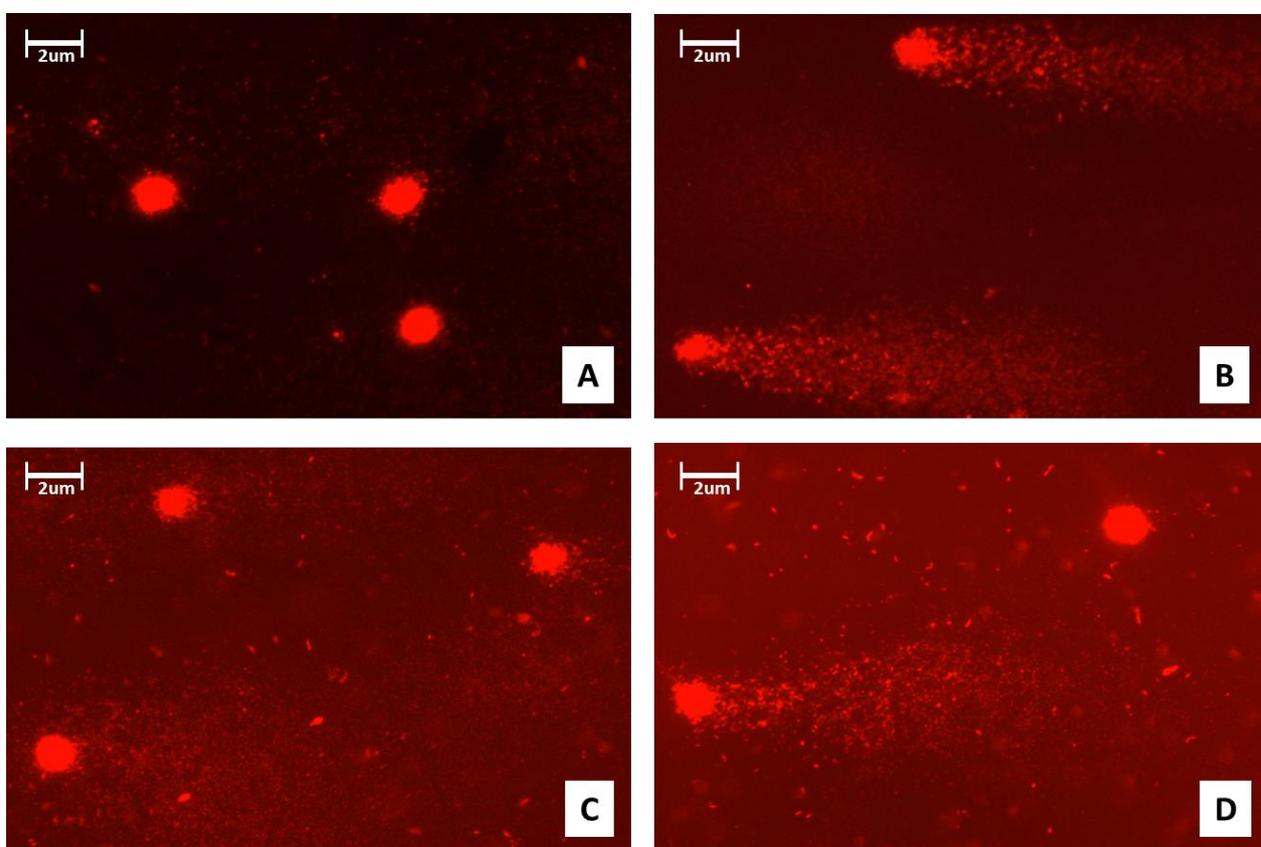


**Figura 14.** Porcentagem de DNA na cauda do cometa como parâmetro de dano genômico mensurado em *P. reticulata* sob exposição aguda ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e chuva (2014) e a  $\text{CL}_{50}$  do  $\text{Cu}^{2+}$ . Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e controles ( $p < 0,05$ ). Porcentagem de DNA da cauda do cometa com base na média de 50 núcleóides analisados por espécime ( $n=5$ ) em cada tratamento. Ciclofosfamida ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo.

Quando expostos ao efluente pesqueiro do período de seca os eritrócitos dos espécimes machos apresentaram maior dano genômico ( $43,99 \pm 9,19\%$ ) quando comparados com o grupo controle para esse mesmo período ( $20,51 \pm 9,14\%$ ). Da mesma forma, os eritrócitos das fêmeas

expostas ao efluente pesqueiro do período de seca também apresentaram maior dano genotóxico ( $41,56 \pm 11,41\%$ ) quando comparados com o grupo controle ( $16,15 \pm 11,45\%$ ).

Os mesmos efeitos genotóxicos da exposição ao efluente pesqueiro do período de seca foram observados no período de chuva (Figura 15), de maneira que, os eritrócitos dos machos apresentaram maior dano genômico ( $35,57 \pm 13,41\%$ ) quando comparados com o grupo controle para esse mesmo período ( $17,55 \pm 9,24\%$ ). Os eritrócitos das fêmeas expostas ao efluente pesqueiro do período de seca também apresentaram maior dano genotóxico ( $27,53 \pm 16,24\%$ ) quando comparados com o grupo controle ( $18,24 \pm 10,10\%$ ).



**Figura 15.** Fotomicrografias de epifluorescência de cometas e nucleóides obtidos a partir de eritrócitos de machos e fêmeas de *P. reticulata* mantidos sob exposição aguda ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . O âncora é disposto à direita das fotomicrografias. Nucleóides sem dano observados no grupo controle (A); Migração do DNA após exposição dos eritrócitos à  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$  (B); Nucleóides com pouco dano genômico obtidos a partir dos espécimes expostos ao efluente pesqueiro no período de seca (C). Grande extensão de dano genômico após exposição ao efluente pesqueiro coletado no período de chuva (D).

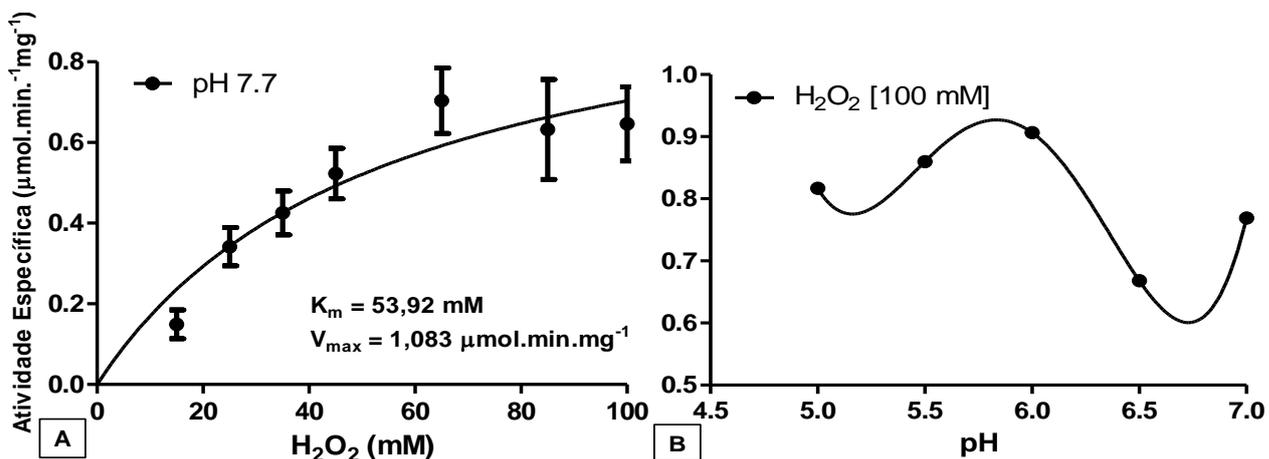
Ao se comparar a genotoxicidade do cobre (como  $CuSO_4$ ) em eritrócitos de machos e fêmeas de *P. reticulata* expostos à  $CL_{50-96h}$  do  $Cu^{2+}$ , foi observado um elevado aumento no dano

genômico nos eritrócitos das fêmeas expostas do que dos machos, mostrando assim uma maior susceptibilidade de dano genômico em fêmeas expostas ao cobre.

#### 7.4.5. Parâmetros cinéticos enzimáticos e atividade específica

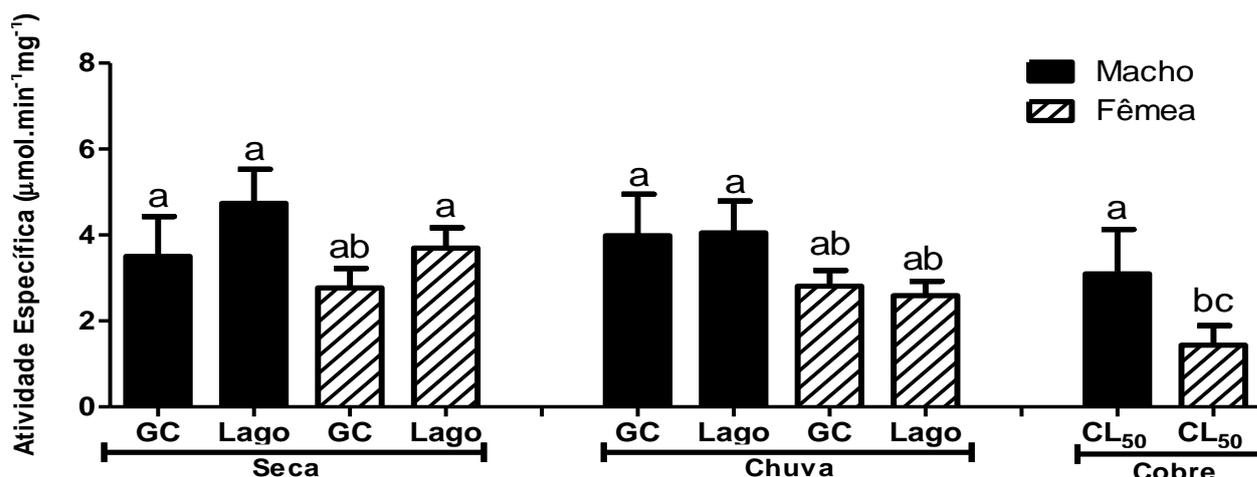
##### 7.4.5.1. Atividade da catalase (CAT)

Para a CAT a velocidade máxima de reação ( $V_{MAX}$ ) obtida com o  $H_2O_2$  foi de  $1,083 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (valor correspondente a atividade específica) sendo a  $K_M$  de  $53,92 \text{ mM}$ . O valor de saturação da CAT foi obtido pela multiplicação da constante  $K_M$  por 2 onde definiu-se a concentração aproximada de  $100\text{mM}$  de  $H_2O_2$  como ótima para o ensaio enzimático (Figura 16A). Em relação ao pH, após a construção da curva da atividade específica em função ao pH, o ótimo enzimático foi obtido pelo pico de máxima atividade específica da CAT sendo definido o pH  $5,83$  como valor padrão (Figura 16B).



**Figura 16.** Em A são apresentados os dados cinéticos ( $K_M$  e  $V_{MAX}$ ) e em B são representados os dados da variação de pH da padronização da atividade da catalase em guppies (*Poecilia reticulata*). Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo os ensaios enzimáticos realizados em triplicata a partir de *pools* de três fígados.

Nos espécimes machos e fêmeas de *P. reticulata* expostos ao efluente pesqueiro do período de seca a atividade específica da CAT não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) quando comparada ao grupo controle desse período, sendo esse mesmo resultado observado quando esses espécimes foram expostos ao efluente pesqueiro do período chuvoso (Figura 17).

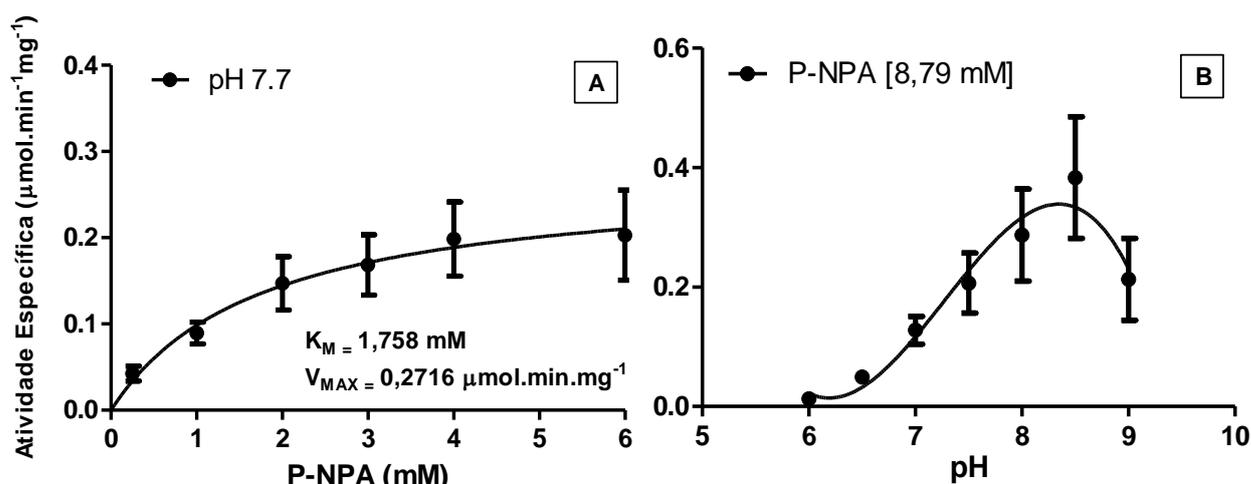


**Figura 17.** Catalase como parâmetro de estresse oxidativo em *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a CL<sub>50</sub> do Cu<sup>2+</sup>. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média da atividade da catalase (CAT) em *pools* (n=3) de fígado de *P. reticulata*. Letras iguais indicam não haver diferença significativa (p>0,05) entre os grupos tratado e controle de cada período de exposição separadamente.

Quando analisada a atividade da CAT sobre o fígado de espécimes de *P. reticulata* expostos a CL<sub>50-96h</sub> do íon cobre (como CuSO<sub>4</sub>) foi evidenciada uma maior sensibilidade das fêmeas em exposição a esse metal, sendo esse aspecto observado pela redução da atividade da CAT sobre esses organismos.

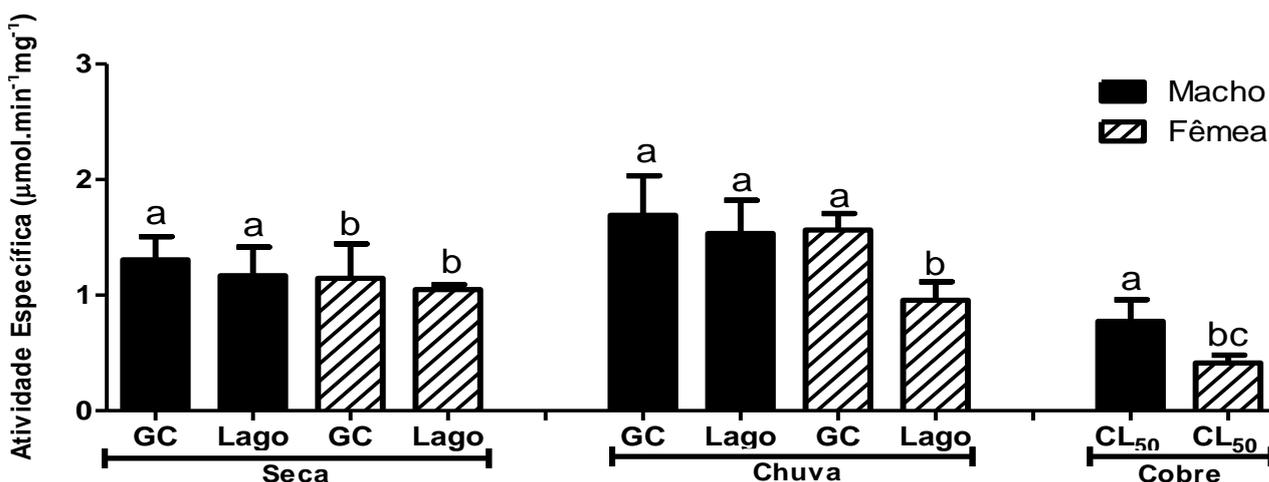
#### 7.4.5.2. Atividade da carboxilesterase (CarbE)

Para a CarbE a velocidade máxima de reação (V<sub>MAX</sub>) obtida com o substrato p-NPA foi de 0,2716 µmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (valor correspondente a atividade específica) sendo a K<sub>M</sub> de 1,758 mM. O valor de saturação da CarbE foi obtido pela multiplicação da constante K<sub>M</sub> por 5 onde definiu-se a concentração de 8,79mM de p-NPA como ótima para o ensaio enzimático (Figura 18A). Em relação ao pH, após a construção da curva da atividade específica em função ao pH, o ótimo enzimático foi obtido pelo pico de máxima atividade específica da CarbE sendo definido o pH 8,33 como valor padrão (Figura 18B).



**Figura 18.** Em A são apresentados os dados cinéticos ( $K_M$  e  $V_{MAX}$ ) e em B são representados os dados da variação de pH da padronização da atividade da carboxilesterase em guppies (*Poecilia reticulata*). Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo os ensaios enzimáticos realizados em triplicata a partir de *pools* de três fígados.

Nos peixes expostos ao efluente pesqueiro do período de seca a atividade específica da CarbE não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparada ao grupo controle desse período, sendo observado esse mesmo resultado tanto em machos quanto em fêmeas. Já em exposição realizada ao efluente pesqueiro do período chuvoso as fêmeas de *P. reticulata* apresentaram redução da atividade enzimática da CarbE, entretanto, em machos não foram observadas diferenças significativas na atividade dessa enzima (Figura 19).

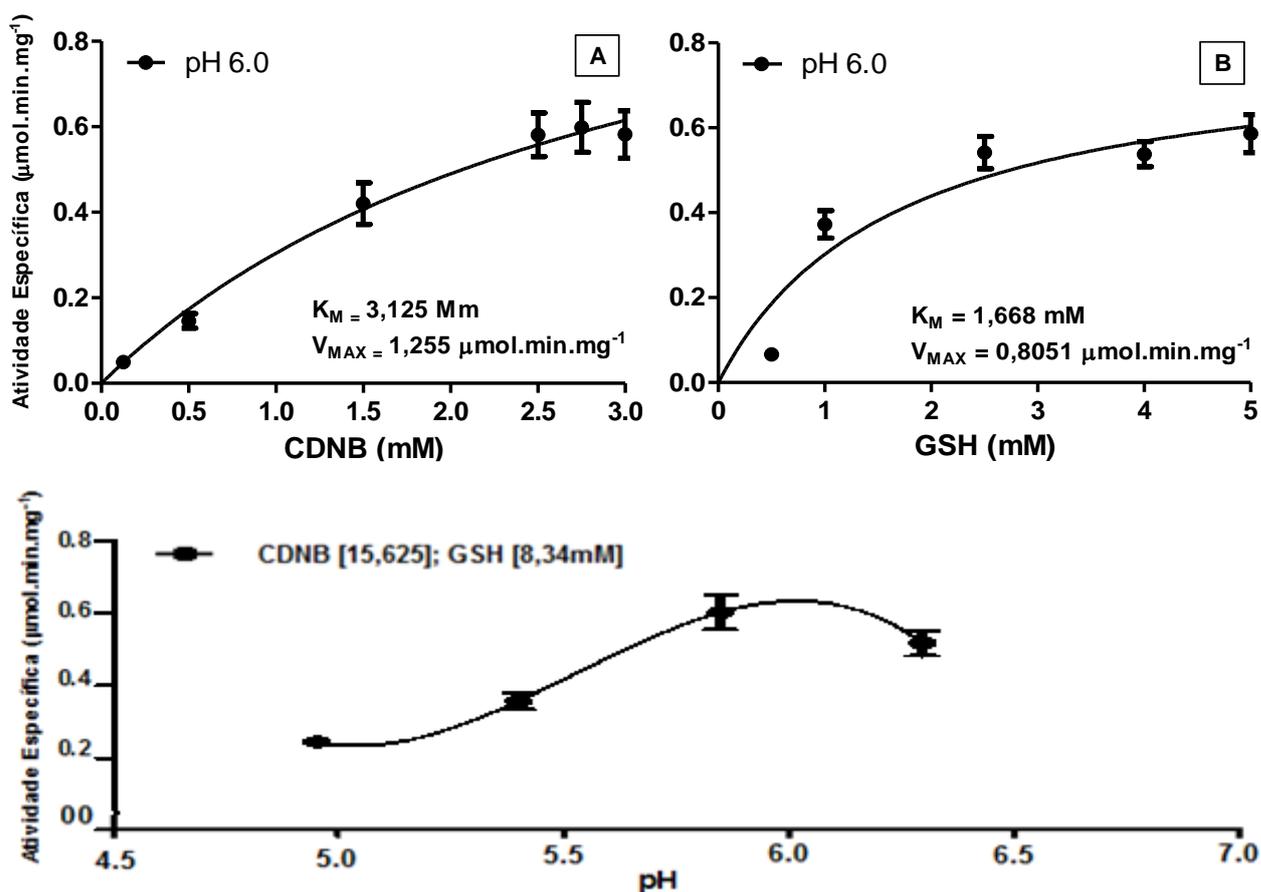


**Figura 19.** Carboxilesterase como parâmetro de biotransformação em *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $\text{Cu}^{2+}$ . Os dados são apresentados como média e erro padrão da média da atividade da carboxilesterase (CarbE) em *pools* ( $n=3$ ) de fígado de *P. reticulata*. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratado e controle de cada período de exposição separadamente.

Quando analisada a atividade da CarbE sobre o fígado de espécimes de *P. reticulata* expostos a CL<sub>50-96h</sub> do íon cobre (como CuSO<sub>4</sub>) foi evidenciada uma maior sensibilidade das fêmeas em exposição a esse metal, sendo esse aspecto observado por uma redução da atividade da CarbE sobre esses organismos.

#### 7.4.5.3. Atividade da glutiona-S-transferase (GST)

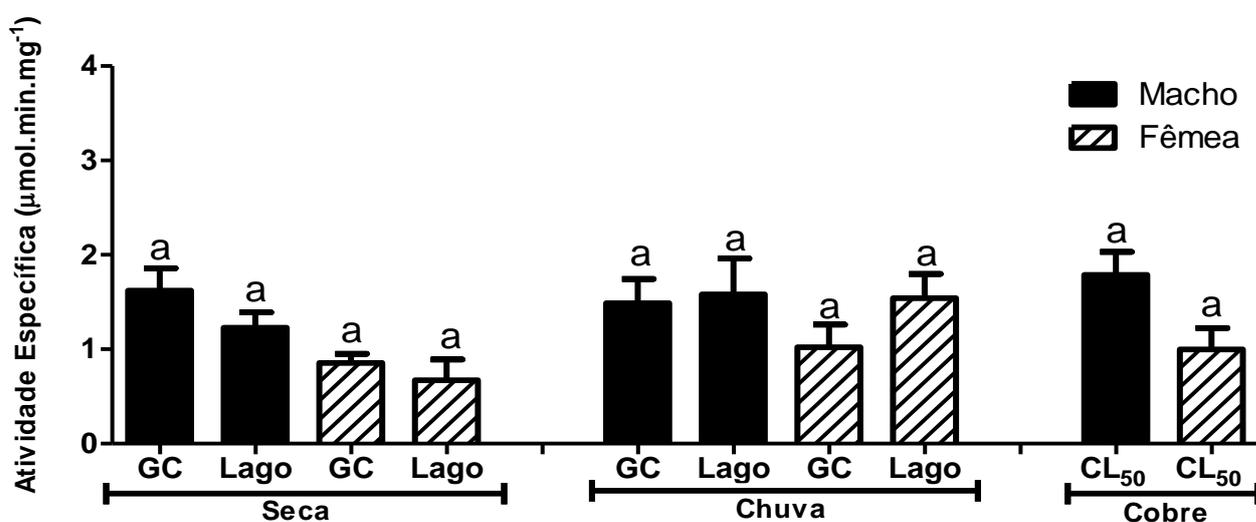
Para a GST a velocidade máxima de reação ( $V_{MAX}$ ) obtida com o CDNB foi de 1,255  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (valor correspondente a atividade específica) e com a GSH foi de 0,8051  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  sendo a  $K_M$  de 3,125 e 1,668 mM, respectivamente. O valor de saturação da GST foi obtido pela multiplicação da constante  $K_M$  por 5, para os dois substratos, onde definiu-se a concentração de 15,625mM de CDNB e 8,34mM de GSH como ótimas para o ensaio enzimático (Figura 20 A e B). Em relação ao pH, após a construção da curva da atividade específica em função ao pH, o ótimo enzimático foi obtido pelo pico de máxima atividade específica da GST sendo definido o pH 6,0 como valor padrão (Figura 20C).



**Figura 20.** Na figura A são apresentados dos dados cinéticos ( $K_M$  e  $V_{MAX}$ ) da atividade da carboxilesterase referentes ao substrato CDNB, e na figura B são apresentados dos dados cinéticos da atividade da carboxilesterase referentes ao substrato GSH. Na figura C é representada a

variação do pH realizada para a padronização da atividade da carboxilesterase. Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, sendo as padronizações realizadas em triplicata a partir de *pools* compostos por três fígados.

Nos peixes expostos ao efluente pesqueiro do período de seca a atividade específica da GST não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) quando comparada ao grupo controle desse período, sendo observado esse resultado tanto em machos quanto em fêmeas de *P. reticulata*. Esse mesmo resultado foi observado quando esses espécimes foram expostos ao efluente pesqueiro do período de chuva não havendo aumento ou diminuição da atividade da GST no fígado desses organismos (Figura 21).



**Figura 21.** Glutathione-S-transferase como parâmetro de biotransformação em *P. reticulata* exposto ao efluente pesqueiro nos períodos de seca e de chuva (2014) e a  $CL_{50}$  do  $Cu^{2+}$ . Os dados são apresentados como média e erro padrão da média da atividade da glutathione-S-transferase (GST) em *pools* ( $n=3$ ) de fígado de *P. reticulata*. Letras iguais indicam não haver diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratado e controle de cada período de exposição separadamente.

Quando analisada a atividade da GST sobre o fígado de espécimes de *P. reticulata* expostos a  $CL_{50-96h}$  do íon cobre (como  $CuSO_4$ ) também não foi observada qualquer alteração na atividade da GST.

## 8. Discussão

### 8.1. Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e orgânicos

Segundo a resolução número 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) as águas do pesqueiro estudado são enquadradas na classe 2, por serem destinadas a atividades de pesca e a balneabilidade. Corpos hídricos dessa classe podem ser destinados ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à

recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais a população possa vir a ter contato direto; à aquicultura e à atividade de pesca (CONAMA, 2005).

Tendo em vista que o lago artificial estudado também possui atividade de balneabilidade, ocorre a exposição direta e por tempo prolongado dos esportistas aquáticos e pescadores às águas contaminadas por  $\text{Cu}^{2+}$ . Nos Estados Unidos as concentrações de cobre são monitoradas de forma sistemática pelo poder público, sendo a Agência de Proteção Ambiental responsável pela determinação da concentração de cobre na água potável, e no caso dessa concentração estar acima de  $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$  medidas de remediação, estabelecidas pelo “*Lead and Copper Rule*”, são tomadas (GRIGOLETTO et al., 2012).

Esse mesmo lago possui uma frequente proliferação de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, e estas, quando expostas a concentrações do  $\text{Cu}^{2+}$  acima do traço podem ter sua membrana celular lisada, liberando cianotoxinas intracelulares para o corpo hídrico (GARCÍA-VILLADA et al., 2004).

Cátions bivalentes de cobre não são biodegradáveis, e uma vez que são liberados nos corpos hídricos, ou lixiviados, eles bioacumulam nos organismos aquáticos. As elevadas concentrações de cobre observadas no pesqueiro ( $0,013 \text{ mg.L}^{-1}$  no período de seca e  $1,709 \text{ mg.L}^{-1}$  no período de chuva) podem estar associadas à utilização de substâncias químicas como o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), conhecido por ser um algicida que atua na redução da biomassa fitoplanctônica, tendo efeito nocivo para microrganismos aquáticos como as cianobactérias produtoras de toxinas (ZHOU et al., 2013; FAN et al., 2014; TSAI, 2015).

Dentre os contaminantes inorgânicos, alguns macronutrientes como o nitrogênio e o fósforo, são liberados no ambiente através de fertilizantes químicos, efluentes de esgotos, queima de combustíveis fósseis ou como resíduos de processos industriais (STARK et al., 2015). Como esses compostos, em sua maioria, apresentam atividade biológica, sua lixiviação coloca em risco, em termos de toxicidade, a biota aquática do corpo hídrico receptor desses contaminantes.

É importante que, em ambientes em que seja utilizado o sulfato de cobre como algicida, se tenha em mente que, após a dissociação desse composto, as cianobactérias reduzem o sulfato livre no corpo hídrico utilizando-o para a síntese de proteínas, coenzimas e para a biossíntese dos sulfolipídeos - lipídeos predominantemente encontrados em membranas fotossintéticas - o que favorece ainda mais para o aumento da biomassa desses organismos (SCHMIDT, 1988).

Outra fonte de contaminação de corpos hídricos devido ao aumento das atividades antrópicas e intenso processo de urbanização tem sido associado às elevadas das concentrações de

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (OTTER et al., 2012). Devido ao pesqueiro estudado possuir sua nascente em uma área de aeroporto na cidade de Goiânia, e os HPAs serem emitidos em sua proximidade por motores de aeronaves e automóveis, a quantificação dessa classe de hidrocarbonetos nos corpos hídricos se torna uma importante informação sobre o estado de poluição desse lago.

Contudo, dentre os contaminantes orgânicos avaliados no lago artificial estudado, não foram observadas elevadas concentrações dos HPAs, provavelmente, devido ao lago não se encontrar nas proximidades da fonte poluidora (aeroporto), alguns estudos (KOROSI et al., 2013; MIKI et al., 2014) demonstram que regiões sob intensa ação antrópica, como o aeroporto Santa Geneveva (Goiânia-GO) possuem altas concentrações desses poluentes que após emissão na atmosfera se depositam sobre os corpos hídricos e solos desencadeando efeitos tóxicos diversos.

Apesar de não terem sido encontradas altas concentrações do pesticida paration (O,O-dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato) e dos herbicidas glifosato (N-fosfometil-glicina) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxiacético), estudos que determinem a concentração dos principais grupos de pesticidas e herbicidas em corpos hídricos são importantes pois a exposição das espécies aquáticas a esses poluentes orgânicos pode causar efeitos ecologicamente importantes sobre os níveis tróficos, sendo bem documentados os casos de redução do sucesso reprodutivo (TIAN et al., 2012), perda neuronal (UYANIKGIL et al., 2009) e dano genômico (HARAYASHIKI et al., 2013) para esses tipos de contaminantes ambientais.

## **8.2. Análise qualitativa e quantitativa do fitoplâncton**

Uma condição favorável à dominância de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, como as pertencentes ao gênero *Anabaena*, é a alta concentração de fósforo dada pela razão N:P no ambiente, assim, o aumento da densidade populacional desses organismos é favorecido em ambientes onde a razão N:P é baixa, como no pesqueiro Jaó (N:P = 0,95 para o período de seca e N:P = para o de chuva 4,79), sendo esse fato observado principalmente em ecossistemas aquáticos eutróficos (SMITH, 1983).

Segundo GIRALDEZ-RUIZ et. al (1999) cianobactérias, como as do gênero *Microcystis* e *Anabaena* (PIERINI & THOMAZ, 2004), possuem a capacidade de utilizar bicarbonato como fonte de carbono, assim, em um lago com pH alcalino como o do pesqueiro do Jaó (pH de 7,99), ocorre uma maior disponibilidade de bicarbonato o que favorece o aumento na densidade populacional dessas cianobactérias (CHI et al., 2011; 2013).

Resultados semelhantes foram encontrados por KIM & KIM, (2013) em avaliação de um corpo hídrico impactado por *blooms* de cianobactérias, onde a dominância desse grupo ocorreu devido as baixas razões observadas entre o nitrogênio total e o fósforo total (N:P < 12) que são descritas como sendo altamente favoráveis para o crescimento de grandes biomassas de cianobactérias, caracterizando a condição eutrófica do ecossistema aquático impactado.

O fósforo é um macronutriente essencial para o crescimento de cianobactérias nas águas doces, entretanto, em elevadas concentrações é responsável pela ocorrência de florações de cianobactérias, devendo a concentração desse elemento ser monitorada nos corpos hídricos, além disso, pouca atenção tem sido dada às interações entre os diferentes contaminantes inorgânicos nos ecossistemas aquáticos (TAO et al., 2013).

As espécimes do gênero *Anabaena* que foram quantificados, apresentaram, em sua maioria, um acineto e um heterócito por filamento, entretanto, sabe-se que as células das cianobactérias filamentosas somente se diferenciam em acinetos (esporos de resistência) quando se encontram em condições ambientais desfavoráveis, seja devido a senescência de uma população ou devido ao emprego de algicidas, como é o caso dos que contém íons cúpricos (SILVA et al., 2013).

O uso de algicidas como o  $\text{CuSO}_4$ , confere risco aos ambientes eutrofizados, pois quando em solução aquosa, se dissocia formando o cátion bivalente  $\text{Cu}^{2+}$ , assim, dentre as espécies de cianobactérias que podem ser afetadas por esse íon, o gênero *Anabaena sp.* possui uma família de proteínas transportadoras de metais bivalentes (DMT ou NRAMP) que são responsáveis pelo transporte de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  da membrana plasmática para o citoplasma (NEVO & NELSON, 2006; GUPTA et al., 2014).

Contudo, o cobre, em concentrações acima do traço, tem sido amplamente utilizado no controle de populações de fitoplâncton nos ecossistemas aquáticos, especialmente em casos de florações de cianobactérias em águas eutróficas. Essa diminuição da biomassa fitoplanctônica é devido ao cobre, em nível celular, ser utilizado como um cofator enzimático capaz de catalisar a formação espécies reativas de oxigênio (radicais livres) devido a sua atividade redox, representando um risco associado ao estresse oxidativo em organismos aquáticos (Nogueira et al. 2009).

Com a indução de estresse oxidativo nas cianobactérias pode ocorrer a lise das células, e, uma vez que grande parte das cianotoxinas são encontradas no meio intracelular, estas serão rapidamente liberadas para o meio extracelular aumentando assim a concentração de cianotoxinas disponíveis no ecossistema contaminado (WERT et al., 2014).

Segundo GARCÍA-VILLADA et al., (2004) a contaminação de corpos hídricos por íons cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) possuem outros efeitos tóxicos sobre cianobactérias, além do estresse oxidativo, sendo que já foram observados mecanismos associados a inibição da fixação de  $\text{CO}_2$ , assim como a inibição da atividade do fotossistema II e da absorção do nitrato.

Uma preocupação com a possível contaminação por cianotoxinas no pesqueiro Jaó, principalmente as MCYSTs, já foi mencionada em estudo realizado por NOGUEIRA et al., (2011), onde foram encontrados 13 táxons produtores de cianotoxinas, dentre eles as espécies *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix agardhii*. Apesar da espécie *P. agardhii* não ter sido encontrada nas amostras quantificadas nesse estudo e a espécie *Microcystis aeruginosa* ter apresentado baixa densidade populacional ( $1.588 \text{ indivíduos.mL}^{-1}$ ) correspondendo a 2,9% de toda a comunidade fitoplanctônica, o gênero *Anabaena*, que atualmente possui algumas espécies reclassificadas *Sphaerospermopsis* (ZAPOMELOVÁ et al., 2010), apresentou elevada densidade populacional ( $15.170 \text{ indivíduos.mL}^{-1}$ ) correspondendo a 28,57% de toda o fitoplâncton amostrado.

### **8.3. Caracterização de microcistina L-R no pesqueiro**

Como não foi verificada a presença de microcistinas (MCYST-LR) nas amostras de água coletadas no pesqueiro, assim como não foi observada a presença dessa cianotoxina em análise do extrato bruto liofilizado de algas, tanto para o período de seca quanto para o período de chuva, não existe um risco associado a contaminação das águas e dos organismos aquáticos por essa cianotoxina.

A caracterização de cianotoxinas realizada diretamente sobre o extrato bruto de algas é importante pois a toxicidade das MCYSTs está relacionada com a sua concentração intracelular nas cianobactérias. As MCYSTs somente são liberadas pelas células vivas durante os processos de estresse físico, químico ou de senescência devido a diminuição da integridade celular de um bloom com o aumento de sua idade. As MCYSTs liberadas na água são responsáveis pela contaminação de vários organismos aquáticos que podem ser expostos, por um longo período de tempo, a uma pequena concentração da toxina (efeito crônico) ou a uma alta concentração destas cianotoxinas - efeito agudo (COMBES et al., 2013).

Outra característica importante da MCYST-LR é sua solubilidade em água e estabilidade estrutural, seja em reservatórios de abastecimento ou em lagos, de modo que, mesmo após processos de ebulição, hidrólise química ou de oxidação, esse peptídeo se mantém, em sua

maioria, inalterado nos corpos hídricos sendo comumente caracterizado como uma cianotoxina persistente (WU et al., 2014).

Devido a estas características são frequentes os estudos demonstram que a intoxicação e consequente morte de diferentes organismos por exposição à MCYSTs como é o caso de peixes (QIAO et al., 2013), bivalves (SABATINI et al., 2011), anfíbios (ZIKOVÁ et al., 2013), micro invertebrados marinhos (EL GHAZALI et al., 2010) e dulcícolas (SHAMS et al., 2014).

São descritos casos graves de intoxicação de animais como cães (WOOD et al., 2010) e o gado bovino (ORR et al., 2001) que são organismos altamente suscetíveis à intoxicação por cianotoxinas devido ao consumo acidental de águas contaminadas com cianobactérias planctônicas de riachos e lagos.

Apesar dos diversos casos de toxicidade a animais, o estudo das MCYSTs passou a ter destaque somente após o primeiro registro mundial de intoxicação em humanos que ocorreu em 1996 no Brasil, em uma clínica de hemodiálise em Caruaru (PE), ocasião em que mais de 60 pacientes faleceram devido à contaminação da água dessa clínica com MCYSTs (SANCHES et al., 2007).

Dentre as diferentes toxicidades associadas a exposição por MCYSTs está a formação de quebras de fita dupla no DNA e consequente interferência nas vias de reparo de dano, contribuindo assim para um aumento na instabilidade genética de células expostas. Essas toxinas também possuem a capacidade de induzir a expressão do fator  $\alpha$  de necrose tumoral (um promotor tumoral) e de proto-oncogenes, sugerindo um possível mecanismo de promoção tumoral (LAUGHINGHOUSE et al., 2012).

Devido aos recorrentes casos de intoxicação humana, principalmente pela ingestão de águas contaminadas com toxinas de cianobactérias, a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou em sua diretriz provisória que a concentração máxima permitida de MCYST-LR seria de  $1\mu\text{g.L}^{-1}$ , entretanto, variações dessa concentração são frequentemente referidas como sendo capazes de promover disfunções hepáticas, reprodutivas (WU et al., 2014) e outros distúrbios fisiológicos (OUDRA et al., 2001).

Assim, como a dominância de um grupo de cianobactérias em uma comunidade fitoplanctônica é determinada de acordo com as variações climáticas, ressalta-se a importância de uma análise periódica da concentração de MCYSTs no pesqueiro, dada suas condições eutróficas, para a predição de eventuais episódios de contaminação devido a dominância de gêneros tóxicos sobre o fitoplâncton.

#### 8.4. Toxicidade e disfunções comportamentais

A espécie *Poecilia reticulata* é comumente referida na literatura como um adequado modelo biológico para ensaios ecotoxicológicos por ter a mesma sensibilidade que outras espécies de peixes de águas doces subtropicais expostos a xenobióticos, sejam eles poluentes químicos ou efluentes urbanos (BERTOLETTI, 2009).

Muitos fatores fisiológicos e ambientais influenciam o desempenho das características comportamentais dos peixes. As alterações comportamentais são como um mecanismo de feedback das respostas fisiológicas induzidas pelos estímulos ambientais (SCOTT & SLOMAN, 2004). Assim, pode-se dizer que o comportamento de um animal, entre outros aspectos, é dado mediante resposta fisiológica frente aos fatores ecológicos bióticos e abióticos que interagem com o organismo (SANTOS et al., 2011; MELVIN & WILSON, 2013). No presente estudo, os espécimes controle, de seca e de chuva, não apresentaram alterações em seus padrões comportamentais, já nos peixes expostos, as alterações comportamentais induzidas parecem ser uma característica associada à toxicidade do cobre e demais poluentes associados que em conjunto formam uma mistura complexa.

Durante todo o experimento, os espécimes expostos de *P. reticulata* apresentaram alterações significativas no comportamento assim como diferentes tipos de padrões reacionais como disfunções tegumentares, natatórias, respiratórias e sociais. Vários autores têm relatado que um mesmo agente estressor pode desencadear distintas alterações comportamentais em peixes (SOVOVÁ et al., 2014; SHARBIDRE et al., 2011; UYANIKGIL et al., 2009). Dentre as disfunções respiratórias o aumento da subida na superfície da água foi a mais frequente sendo este comportamento conhecido como uma tentativa de fuga do peixe para evitar respirar em águas contaminadas. Observações semelhantes foram relatadas por NANDAN & NIMILA (2012) em *Etroplus maculatus* exposto ao lindano, um organoclorado usado como pesticida.

Alterações comportamentais são consideradas como biomarcadores de estresse tardio sendo conhecidos quadros de intoxicação em machos de *Poecilia reticulata* expostos ao cobre (MACHADO et al., 2013) relacionando-os a processos de desregulação endócrina, alterações imunológicas, natatórias, enzimáticas e hepatotoxicidade evidenciada por análise histopatológica.

A exposição dos espécimes de *P. reticulata* ao cobre também promoveu um comportamento agressivo além de movimentos anormais de natação seguido de hiperatividade, sendo essas mesmas disfunções natatórias observadas em espécimes de *Danio rerio* (zebrafish) expostos às concentrações de 0,1; 0,25; e 0,6  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (TILTON et al., 2011). Em peixes, o comportamento de natação alterado está relacionado às disfunções na atividade locomotora sendo

frequentemente observado em resposta à toxicidade de xenobióticos ao sistema nervoso (ZHANG et al., 2013). Comumente, os peixes apresentam progressivas alterações comportamentais antes da morte. Nesse estudo, os espécimes de *P. reticulata*, após 96 horas de exposição ao cobre apresentaram comportamento de natação letárgico e exibiram hiperatividade transitória antes da morte conforme descrito por SHARBIDRE et al. (2011).

Segundo BAGANZ et al. (2004) a redução na capacidade de natação e o comprometimento do sistema respiratório dos peixes, pode diminuir a capacidade desses organismos de responder a estímulos de busca e competição por alimento, fazendo com que se tornem mais letárgicos e vulneráveis aos predadores. As alterações comportamentais observadas são determinantes de baixas ou iniciais perturbações (estresse) aos espécimes, sendo consideradas *endpoints* toxicológicos indicativos de distúrbios subletais, permitindo assim a previsão de consequências ecológicas (VOGL et al., 1999).

Existe um grande número de estudos na literatura que associam mudanças nos padrões comportamentais com os efeitos neurotóxicos da exposição à poluentes, como as toxinas de cianobactérias (WILGES et al., 2012). Segundo PINHEIRO, BELTRAN & NEILAN (2000) alterações no comportamento locomotor *Danio rerio* e *Leucaspilus delineatus* foram observadas após exposição à MCYST-LR. Também são conhecidas cianotoxinas neurotóxicas em vários outros grupos de cianobactérias, sendo a anatoxina-a - identificada em *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria* spp., *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Cylindrospermum* spp. – uma das mais estudadas por ser um alcalóide que age como análoga da acetilcolina, bloqueando a transmissão elétrica dos neurônios o que pode gerar disfunções na junção neuromuscular, promovendo assim alterações comportamentais associadas a esse mecanismo (RODRÍGUEZ et al., 2006).

Estudos ecotoxicológicos que avaliem efluentes urbanos, pesqueiros, ou quaisquer outros corpos hídricos que apresentem um aumento na biomassa de cianobactérias, quando utilizarem as alterações comportamentais em peixes como um marcador de toxicidade, devem associar a essa análise a quantificação de algumas das principais neurotoxinas de cianobactérias, para que assim seja possível uma melhor compreensão dos mecanismos associados às disfunções comportamentais.

Limites referentes aos valores da CE<sub>50</sub>, como a comportamental, devem ser implementados nas resoluções que tratam sobre a vazão de efluentes (nº 420) e os próprios pesqueiros (nº 357), uma vez que, em resolução própria, o Conselho Nacional do Meio Ambiente somente define que

as fontes poluidoras dos recursos hídricos deverão buscar práticas de gestão ou técnicas para a melhoria da qualidade dos efluentes gerados (CONAMA, 2011).

### **8.5. Histopatologias associadas ao efluente pesqueiro**

Em relação ao metabolismo de xenobióticos, o fígado e o intestino são os órgãos mais importantes para os estudos toxicológicos, pois neles são encontradas as maiores taxas de metabolização em vertebrados, sendo as brânquias e os rins os órgãos que possuem menor atividade de metabolização desses compostos (GÜNES & YERLI, 2011).

O cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) é essencial para os processos celulares normais na maioria dos organismos eucarióticos mas é tóxico em excesso (UPADHYAY & PANDA, 2010). A análise histopatológica realizada neste estudo sugere uma relação positiva entre as concentrações de cobre e a ocorrência de alterações histológicas em fígado e intestino de espécimes de *P. reticulata*. Estudos semelhantes descritos anteriormente confirmam a toxicidade do cobre e seus efeitos nocivos em diferentes espécies de peixes como *Cyprinus carpio* (CL50-96h = 1,40 mg.L<sup>-1</sup>) (DAS & DAS, 2005), *Danio rerio* (CL50-96h = 94 µg.L<sup>-1</sup>) (LUZIO et al., 2013), *Tilapia rendalli* (CL50-96h = 0,92 mg.L<sup>-1</sup>) (BERTOLETTI, 2009), *Carassius auratus* (CL50-96h = 0,30 mg.L<sup>-1</sup>) e *Xiphophorus helleri* (CL50-96h = 0,36 mg.L<sup>-1</sup>) (JAMES et al., 2008).

Alguns autores têm relatado alterações histopatológicas em tecidos do intestino de peixes expostos aos metais pesados (WANG et al., 2015; MARIJIC & RASPOR, 2007; JAYAPRAKASH, et al., 2015). Na maioria dos casos, as histopatologias intestinais são caracterizadas por danos nos enterócitos epiteliais (JIANG, et al., 2013), apoptose (WANG et al., 2015), centros de melanomacrófagos (SATIZABAL & MAGOR, 2015), encurtamento das vilosidades e aumento no diâmetro da lâmina própria (FUNES et al., 2014). A presença de centros de melanomacrófagos em tecidos do fígado, rim e intestino está relacionada às doenças infecciosas e a exposição às substâncias químicas contaminantes ambientais, como os xenobióticos, sendo a distribuição desses centros indicadores de condições estressantes no ambiente aquático ao qual os organismos foram expostos (AGIUS E ROBERTS, 2003).

Nesse estudo, com a utilização da técnica histoquímica de Perls (modificada para cobre), observou-se a deposição de cobre sobre o parênquima hepático dos espécimes machos e fêmeas de *P. reticulata* expostos ao efluente pesqueiro do período de seca e chuva, sendo essa deposição já descrita em literatura por STORI et al, (2014). Resultados semelhantes foram encontrados por CARVALHO & FERNANDES (2008) para uma espécie de peixe (*Prochilodus lineatus*) onde

também houve acúmulo de cobre sobre o tecido hepático, sendo essa deposição influenciada pela variação de pH na água dos peixes expostos.

O acúmulo de metais pesados, como o  $\text{Cu}^{2+}$ , no fígado e a sua atividade biológica sobre o intestino, provavelmente, é devido às funções fisiológicas e metabólicas desses órgãos em peixes. Possíveis mecanismos de interação do  $\text{Cu}^{2+}$  com o intestino podem ser atribuídos à presença da camada mucosa intestinal que facilita o rápido acúmulo e absorção de metais após o contato com a água circundante e a deposição de frações de sedimento contendo  $\text{Cu}^{2+}$  sobre as criptas das vilosidades intestinais (JAYAPRAKASH, et al., 2015).

Em peixes, o epitélio gastrointestinal é coberto por uma extensa e delgada camada muco, onde, bactérias, vírus, particulados orgânicos e inorgânicos são retidos e posteriormente removidos pela corrente de água e movimentos peristálticos. Nesse contexto, as infecções ocorrem somente quando há uma invasão das barreiras mucosas (MAREL et al., 2012). Os principais componentes da camada de muco são as mucinas, grandes glicoproteínas filamentosas glicosiladas, que são fortemente aderentes e desempenham um papel importante na defesa imunológica, lubrificação, digestão e absorção intestinal, sendo sintetizadas pelas células caliciformes além de outros tipos celulares (LEKNES, 2011).

Nesse estudo, os peixes expostos aos efluentes pesqueiros, de seca e chuva, contendo diferentes concentrações de cobre, tiveram maior área das células caliciformes com consequente aumento na síntese de mucina, e crescimento no diâmetro das vilosidades intestinais. Tal como descrito para as guelras, a hipersecreção de mucina é parte de uma resposta de defesa aos poluentes e contribui para reduzir a entrada de substâncias tóxicas para as células epiteliais (FERNÁNDEZ et al., 2013). Assim, pode-se inferir que a elevada produção de mucina é uma resposta fisiológica frente ao estresse causado pelo cobre de modo que esses mesmos resultados foram observados quando os espécimes de *P. reticulata* foram expostos a  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  do  $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,82 \pm 0,17 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ ). Ressalta-se que, após análise morfométrica intestinal, a contaminação por cobre é a responsável pela ocorrência das histopatologias descritas nesse estudo, podendo haver outros poluentes associados que em conjunto podem contribuir para o aumento da toxicidade dessas águas.

#### **8.6. Genotoxicidade do efluente pesqueiro**

Numerosos estudos têm mostrado que a porcentagem de DNA na cauda do cometa (%DNA in Tail) é um parâmetro eficiente na determinação do dano genômico induzido em células sanguíneas de animais expostos (AHMED et al., 2010, 2011; DABROWSKA et al., 2014;

ROCCO et al., 2015; KOVÁCKS et al., 2015) concluindo assim que a utilização do ensaio cometa, com o emprego desse parâmetro, se torna uma ferramenta importante na avaliação da genotoxicidade em organismos aquáticos.

Em corpos hídricos contaminados, como o do pesqueiro estudado, uma maior concentração de poluentes ambientais é responsável pela formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio as quais, devido as elevadas concentrações, não são eliminadas pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e moleculares. Esse desbalanceamento no mecanismo oxidativo celular, pode contribuir para a promoção de danos na molécula de DNA, gerando quebras de fita simples ou dupla que podem não ser corrigidas pelas enzimas de reparo durante o ciclo celular (YILDIZ et al., 2009). Em nosso estudo, foram encontradas contaminações no efluente pesqueiro por metais pesados (cobre) e macronutrientes (nitrogênio e fósforo), tanto no período de seca quanto no chuvoso, podendo esses contaminantes ser associados aos danos no DNA observados nos eritrócitos de guppies.

Assim, o dano genômico induzido nos eritrócitos de *P. reticulata*, em comparação com a exposição a  $CL_{50-96h}$  do  $Cu^{2+}$ , pode ser associado as altas concentrações de cobre encontradas no efluente do período de seca ( $0,013mg.L^{-1}$ ) e do período de chuva ( $1,709mg.L^{-1}$ ). O cobre, em sua forma iônica, é um metal pesado que interage nos mecanismos de oxidação e redução celulares, podendo induzir a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e os radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), sendo estas consideradas moléculas tóxicas que, em altas concentrações celulares promovem danos ao DNA, peroxidação lipídica, dentre outras disfunções celulares (UPADHYAY & PANDA, 2010). Outro possível mecanismo de genotoxicidade do  $Cu^{2+}$  (como  $CuSO_4$ ) está associado a inibição o metabolismo oxidativo em mitocôndrias devido aos danos oxidativos nos fosfolipídios e proteínas estruturais das membranas mitocondriais, gerando a lise das mitocôndrias, e em alguns casos apoptose (WANG et al., 2015).

Segundo CALIANI (2014) o sexo dos espécimes utilizados em ensaios genotoxicológicos representa um fator importante na variação intraespecífica do dano genômico, sendo recomendado a realização desses estudos em espécies onde o dimorfismo sexual seja uma característica evidente. Para KIRSTEN & BERNARDI (2009) a maior sensibilidade encontrada nos espécimes fêmeas do que nos machos está relacionada a fatores endócrinos, sendo a serotonina um exemplo de hormônio que atua de modo distinto nos dois sexos, apresentando diferentes concentrações séricas em machos e fêmeas. Em estudo realizado em *Pimephales promelas* sobre o efeito neuroendócrino da fluoxetina, um inibidor seletivo da receptação de serotonina, foram observadas

diferentes respostas reprodutivas, de fuga á predação e alimentação entre os espécimes machos e fêmeas dessa espécie (WEINBERGER & KLAPER, 2014).

Assim, ressalta-se a importância dos estudos em espécimes machos e fêmeas, separadamente, tendo em vista que no peixe avaliado, a porcentagem de genômico foi maior nas fêmeas do que nos machos, fato esse que evidencia a maior sensibilidade das fêmeas para as alterações no DNA devido a possíveis falhas no mecanismo de reparo ou até mesmo disfunções endócrinas. Tais danos na molécula de DNA também podem levar à instabilidade cromossômica e conseqüentemente alterações patológicas em células e tecidos, resultando em anormalidades morfológicas, doenças cancerígenas, redução da taxa de fecundidade e sobrevivência populacional (AUGUSTYNIAK et al., 2014).

### **8.7. Atividade da catalase, carboxilesterase e glutathione-S-transferase**

São escassos os estudos que padronizam os ensaios de atividade enzimática pela utilização da constante cinética de Michaelis–Menten ( $K_M$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{MAX}$ ) (BASTOS *et al.*, 2013; OU *et al.*, 2014). Ressalta-se a necessidade desses estudos de padronização para que seja possível a comparação dos resultados obtidos entre diferentes espécies de organismos assim como para que possa ser estabelecida a comparação entre os efeitos da exposição a diferentes contaminantes ambientais.

Admitindo que a interação entre os contaminantes químicos e os organismos aquáticos ocorre, primeiramente, a nível molecular, a detecção dos efeitos da exposição a substâncias químicas é de caráter preditivo dos efeitos biológicos, assim a utilização de biomarcadores bioquímicos tem sido bem sucedida para se avaliar os efeitos de efluentes sobre a saúde e integridade dos organismos aquáticos (KAMEL *et al.*, 2012).

Nesse sentido a catalase (CAT), carboxilesterase (CarbE) e glutathione-S-transferase (GST) são enzimas utilizadas na detecção dos efeitos subletais da exposição a contaminantes ambientais como os metais pesados (FATIMA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2013), pesticidas (EZEMONYE & TONGO, 2010), herbicidas (SAMANTA *et al.*, 2014), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (JIN *et al.*, 2014), cianotoxinas (LI LI *et al.*, 2015) dentre outros xenobióticos.

Nesse estudo foram observados que os espécimes de *P. reticulata* expostos ao efluente peixeiro não apresentaram variação da atividade da CAT. A provável inibição da SOD e conseqüente ausência de  $H_2O_2$  como produto de sua catalise, podem justificar o não aumento da síntese ou expressão da CAT. A inibição da SOD por metais pesados é descrita em estudo realizado por CHANDRAN *et al.*, (2005), onde a espécie *Achantina fulica* apresentou atividade de

SOD reduzida devido a inibição pelo zinco. GU *et al.*, (2006) também observaram a inibição da SOD em brânquias de moluscos bivalves (*Pinctada fucata*) expostos a altas concentrações de cobre.

A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são algumas das enzimas envolvidas na detoxificação das espécies reativas de oxigênio (EROs). A SOD é responsável pela dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a  $H_2O_2$  sendo comumente localizada na mitocôndria pois nessa organela ocorre a formação da maior parte das EROs contidas nas células. Assim, o  $H_2O_2$  gerado é detoxificado pela CAT por meio da redução direta do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (MAIA *et al.*, 2012).

Dentre as enzimas capazes de desintoxicar organismos expostos a xenobióticos estão a CarbE e GST, presentes respectivamente na fase-I e fase II de biotransformação hepática (RIBALTA *et al.*, 2015). Após exposição das fêmeas de *P. reticulata* ao efluente pesqueiro do período de chuva (concentração de cobre de  $1,709 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi observado uma redução na atividade da CarbE sugerindo que as águas desse pesqueiro estão desencadeando efeitos subletais pela contaminação por xenobióticos.

Sabe-se que a inibição das esterases por metais é devido a alterações fisiológicas que indiretamente resultam na redução da atividade enzimática, de modo que esta inibição não ocorre pela ação direta do metal sobre a enzima (LIMA *et al.*, 2013). Assim, como a atividade da CarbE, é afetada pela exposição ao cobre, estudos ambientais utilizando biomarcadores enzimáticos de contaminação por esse metal devem considerar o uso dessa enzima.

Ressalta-se ainda que, como em período chuvoso as águas do pesqueiro foram responsáveis pela redução da atividade da CarbE, caso ocorram episódios de contaminação por HPAs (como os presentes no aeroporto situado nas adjacências da nascente do pesqueiro) os peixes expostos não serão capazes de biotransformar esses contaminantes em compostos mais solúveis, sendo assim promovidas intoxicações e complicações patológicas que podem levar a morte.

Em relação a segunda fase de biotransformação, apesar de não serem observados efeitos na atividade da GST após exposição dos peixes ao efluente, é descrito em literatura que as isoenzimas de GST também são inibidas pelo cobre, devido a sua capacidade de ligação aos metais pesados (GOODRICH & BASU, 2012). Em estudo realizado por GARCIA *et al.*, (2000), após avaliação da atividade da GST em amostras de fígado de *Phycis blennoides* expostos às águas contaminadas por organoclorados e outros xenobióticos foi observada atividade de  $0,43 \mu\text{mol.min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , em meio reacional contendo 1 mM de CDNB e 1 mM de GSH. Nesse estudo foram encontrados valores da atividade da GST aproximadamente quatro vezes maiores em

machos ( $1,58 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) e fêmeas ( $1,54 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) expostos ao efluente pesqueiro do período chuvoso, evidenciando assim que atividade enzimática é variável entre espécies distintas.

Como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), substrato exógeno utilizado em nosso estudo, é empregado na avaliação da atividade geral da GST, ou seja, possui afinidade pelo sítio catalítico de todas as isoformas dessa enzima, pode ocorrer que, em análise separada de cada isoforma uma delas aumente sua atividade e outra reduza, não sendo esse resultado evidenciado em uma análise conjunta das isoformas como a realizada em nosso estudo. Segundo BASTOS *et al.*, (2013) dentre as isoformas mais estudadas da GST estão a pi ( $\pi$ ), mi ( $\mu$ ) e alfa ( $\alpha$ ) sendo a  $\pi$  e a  $\alpha$  relacionadas a capacidade celular de reduzir alguns peróxidos orgânicos protegendo as células do estresse oxidativo e a isoforma  $\mu$  relacionada com a biotransformação do benzo[a]pireno, um HPA.

A manutenção de níveis normais de atividade da GST é importante no estabelecimento da homeostase em organismos aquáticos. Como em estudo da composição fitoplanctônica das águas do pesqueiro foram identificados alguns gêneros de cianobactérias produtoras de MCYSTs, como o *Microcystis* sp. e *Anabaena* sp., é provável que em florações com maior densidade desses grupos ocorra a liberação dessa cianotoxina sobre o corpo hídrico.

Os peixes intoxicados com MCYSTs possuem como mecanismos de detoxificação a formação do complexo GS-MCYST pela GST sendo esse conjugado de alta solubilidade e fácil excreção pelo organismo (PFLUGMACHER *et al.*, 2001). Assim, os níveis celulares de glutathione reduzida (GSH) e de GST são indicadores de mecanismos de detoxificação para uma adaptação biológica à sobrevivência de organismos expostos às MCYSTs (COMBES *et al.*, 2013).

## 9. Conclusão

Conclui-se que a exposição de peixes às concentrações subletais do cobre causam distúrbios comportamentais, histopatologias intestinais, aumento na síntese de mucinas, deposição de  $\text{Cu}^{2+}$  no parênquima hepático, danos ao DNA e redução da atividade da carboxilesterase. Estas alterações são potencialmente prejudiciais para a sobrevivência de espécimes de *P. reticulata*, assim como para as demais espécies de organismos que compõem a fauna e flora aquática do pesqueiro estudado. Esse estudo fornece dados importantes sobre os efeitos ecotoxicológicos da exposição a contaminantes, como o cobre, de modo que este fato deve ser levado em consideração quando o  $\text{CuSO}_4$  for utilizado no controle de florações de cianobactérias e outras algas em geral. Medidas mitigadoras devem ser tomadas no pesqueiro para que se reduza a contaminação por

cobre, macronutrientes, e para que não haja contaminação por HPAs oriundos do aeroporto, evitando assim os riscos potenciais à comunidade aquática e pesqueira.

## 10. Referências Bibliográficas

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1523, n. 1, p. 37–48, 2000.

AMÉ, M. V.; GALANTI, L. N.; MENONE, M. L.; GERPE, M. S.; MORENO, V. J.; WUNDERLIN, D. A. Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. **Harmful Algae**, v. 9, n. 1, p. 66–73, jan. 2010.

ANGHILERI, D.; PIANOSI, F.; SONCINI-SESSA, R. Trend detection in seasonal data : from hydrology to water resources. **Journal of Hydrology**, v. 511, p. 171–179, 2014.

ARALDI, R. P.; MELO, T. C. de; MENDES, T. B.; JÚNIOR, P. L. de S.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; CARVALHO, R. F. de; SOUZA, E. B. de; STOCCO, R. de C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies : A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.

ARAÚJO, C. V. M.; COHIN-DE-PINHO, S. J.; DA S SANTOS, J.; DELGADO, F.; SANTANA, L. C. S.; CHASTINET, C. B. a; DA SILVA, E. M. In situ and laboratory bioassays using *Poecilia reticulata* Peters, 1859 in the biomonitoring of an acidic lake at Camaçari, BA, Brazil. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 599–603, out. 2006.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181–182, p. 441–6, 27 dez. 2002.

BAGANZ, D.; STAAKS, G.; PFLUGMACHER, S.; STEINBERG, C. E. W. Comparative study of microcystin-LR-induced behavioral changes of two fish species, *Danio rerio* and *Leucaspis delineatus*. **Environmental toxicology**, v. 19, n. 6, p. 564–70, dez. 2004.

BASTOS, F. F.; HAUSER-DAVIS, R. A.; TOBAR, S. A. L.; CAMPOS, R. C.; ZIOLLI, R. L.; BASTOS, V. L. F. C.; BASTOS, J. C. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 414–423, 2013.

BERTOLETTI, E. Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de Água Doce Utilizadas no Brasil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1–3, p. 9–13, 2009.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística : princípios e aplicações**. Editora Artmed, 2009.

CASTRO, A. R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; MELO, A. L. A.; MARTINS, L. S. F.; KATIANE, M. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotrop.** v.4, n. 1, p.01–39 , 2004.

CHAPMAN, M. G. Paucity of mobile species on constructed seawalls : effects of urbanization on biodiversity. **Marine Ecology Progress Series** v. 264, p. 21–29, 2006.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STELINA, R. The Comet Assay: Topical Issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.

COMBES, A.; DELLINGER, M.; CADEL-SIX, S.; AMAND, S.; COMTE, K. Ciliate *Nassula* sp. grazing on a microcystin-producing cyanobacterium (*Planktothrix agardhii*): impact on cell growth and in the microcystin fractions. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 126, p. 435–441, 15 jan. 2013.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente em Resolução nº 357 de 11 de março de 2005 que dispõe sobre diretrizes de enquadramento dos corpos d'água e dá outras providências. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, 2005.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente em Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 11 de março de 2005, do CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, 2011.

CORBEL, S.; MOUGIN, C.; BOUAÏCHA, N. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. **Chemosphere**, v. 96, p. 1–15, mar. 2014.

CORRÊA, J. M.; PENAFORT, J. M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (Crustacea: Branchiopoda : anostraca). **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 12, n. 12, p. 1–11, 2011.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, P. R.; PEREIRA, P.; GUILHERME, S.; BARATA, M.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M.; POUSÃO-FERREIRA, P. Hydroxybenzoate paralytic shellfish toxins induce transient GST activity depletion and chromosomal damage in white seabream (*Diplodus sargus*). **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 63–69, 2012.

DE SOUZA FILHO, J.; SOUSA, C. C. N.; DA SILVA, C. C.; DE SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; GRISOLIA, C. K. Mutagenicity and genotoxicity in gill erythrocyte cells of *Poecilia reticulata* exposed to a glyphosate formulation. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 91, n. 5, p. 583–7, nov. 2013.

EL GHAZALI, I.; SAQRANE, S.; CARVALHO, A. P.; OUAHID, Y.; DEL CAMPO, F. F.; OUDRA, B.; VASCONCELOS, V. Effect of different microcystin profiles on toxin bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae via *Artemia* nauplii. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 5, p. 762–70, jul. 2010.

ETCHEGARAY, A.; BUENO, C. de C. Identificação de Microcistina-LR ao Nível Molecular Empregando Microscopia de Força Atômica. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1–4, 2010.

EYCKMANS, M.; CELIS, N.; HOREMANS, N.; BLUST, R.; DE BOECK, G. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 103, n. 1–2, p. 112–20, maio 2011.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, jan. 1985.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 149–156, 2002.

GARCÍA-VILLADA, L.; RICO, M.; ALTAMIRANO, M. M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; LÓPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algicide. **Water research**, v. 38, n. 8, p. 2207–13, abr. 2004.

GENG, L.; QIN, B.; YANG, Z. Unicellular *Microcystis aeruginosa* cannot revert back to colonial form after short-term exposure to natural conditions. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 104–108, 2013.

GIRALDEZ-RUIZ, N.; BONILLA, I.; FERNANDEZ-PINAS, F. Role of external calcium in homeostasis of intracellular pH in the cyanobacterium *Anabaena* sp . strain PCC7120 exposed to low pH. **New Phytology**, v. 5, n. 141, p. 225–230, 1999.

GÓMEZ, A. G.; JUANES, J. a; ONDIVIELA, B.; REVILLA, J. a. Assessment of susceptibility to pollution in littoral waters using the concept of recovery time. **Marine pollution bulletin**, v. 81, p. 140–148, 24 fev. 2014.

GONÇALVES-SOARES, D.; ZANETTE, J.; YUNES, J. S.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. M.; BAINY, A. C. D. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. **Marine Environmental Research**, v. 75, p. 54–61, 2012.

GONZÁLEZ, J. F.; REIMSCHUESSEL, R.; SHAIKH, B.; KANE, A. S. Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight finfish species. **Marine Environmental Research**, v. 67, n. 4–5, p. 183–188, 2009.

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 113C, p. 47–54, jul. 2014.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à genética**. Editora Guanabara Koogan, 10ª Ed, 2013.

GUMPU, M. B.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. A review on detection of heavy metal ions in water - An electrochemical approach. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 213, p. 515–533, 2015.

GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; DATTA, S.; VEER, V.; WALTHER, C. Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. **Chemosphere**, v. 108, p. 134–44, ago. 2014.

HANUS, O.; VORLICEK, Z.; SOJKOVA, K.; ROZSYPAL, R.; VYLETELOVA, M.; ROUPAL, P.; GENCUROVA, V.; POZDISEK, J.; LANDOVA, H. A comparison of selected milk indicators in organic herds with conventional herd as reference. **Folia Veterinaria**, v. 52, n. 3–4, p. 155–159, 2008.

HARAYASHIKI, C. A. Y.; VARELA, A. S.; MACHADO, A. A. D. S.; CABRERA, L. D. C.; PRIMEL, E. G.; BIANCHINI, A.; CORCINI, C. D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 142–143, p. 176–84, 15 out. 2013.

HESPANHOL, I. Poluentes Emergentes, Saúde Pública e Reúso Potável Direto. **Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia E Gestão**, v. Cap. 20, p. 501–537, 2013.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. a. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 8, p. 2090–5, nov. 2009.

ISHIDA, K.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; OKINO, T.; MURAKAMI, M. Aeruginosins, Protease Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, v. 55, p. 10971–10988, 1999.

JAGER, T.; BARSI, A.; HAMDA, N. T.; MARTIN, B. T.; ZIMMER, E. I.; DUCROT, V. Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: Applications and outlook. **Ecological Modelling**, v. 280, p. 140–147, maio 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304380013003190>>. Acesso em: 10 maio. 2014.

JAVED, M.; AHMAD, I.; USMANI, N.; AHMAD, M. Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. **Chemosphere**, v. 151, p. 210–219, 2016.

KHAN, F. A.; ANSARI, A. A. Eutrophication : An Ecological Vision. **The Botanical Review**, v. 71, n. December, p. 449–482, 2005.

KIM, T.-H.; KIM, G. Factors controlling the C:N:P stoichiometry of dissolved organic matter in the N-limited, cyanobacteria-dominated East/Japan Sea. **Journal of Marine Systems**, v. 115–116, p. 1–9, abr. 2013.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em toxicologia**. 2ª Edição, Editora McGraw-Hill, 2012

KOMÁREK, J. Coccoid and colonial cyanobacteria. **Freshwater Algae of North America**, p. 59–116, 2003.

LARSSON, D. G. J.; KINNBERG, K.; STURVE, J.; STEPHENSEN, E.; SKÖN, M.; FÖRLIN, L. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 52, n. 1, p. 13–20, maio 2002.

LAUGHINGHOUSE, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D.-S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **The Science of the total environment**, v. 432, p. 180–8, 15 ago. 2012.

LEITE, U. B. O Sol - Revista Jaó. **O Sol - O Jaó em Revista**, v. 235, p. 1–52, 2011. Disponível em: <<http://www.jao.com.br/o-clube/revista-o-sol-235/>>.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LETICIA, A. G.; GERARDO, G. B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 787–797, 2008.

LOPES, F. M.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; DA SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; TAVARES, G.; DA ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 155C, p. 322–326, 12 jul. 2014.

LÜRLING, M.; VAN OOSTERHOUT, F. Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. **Water research**, v. 47, n. 17, p. 6527–37, 1 nov. 2013.

MACEDA-VEIGA, A.; MONROY, M.; DE SOSTOA, A. Metal bioaccumulation in the Mediterranean barbel (*Barbus meridionalis*) in a Mediterranean river receiving effluents from urban and industrial wastewater treatment plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 76, n. 2, p. 93–101, fev. 2012.

MACHADO, A. A. D. S.; HOFF, M. L. M.; KLEIN, R. D.; CARDOZO, J. G.; GIACOMIN, M. M.; PINHO, G. L. L.; BIANCHINI, A. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 138–139, p. 60–9, 15 ago. 2013.

MELO-MAGALHÃES, E. M.; MEDEIROS, P. R. P.; LIRA, M. C. a; KOENING, M. L.; MOURA, a N. Determination of eutrophic areas in Mundaú/Manguaba lagoons, Alagoas-Brazil, through studies of the phytoplanktonic community. **Brazilian journal of biology**, v. 69, n. 2, p. 271–80, maio 2009.

MEREL, S.; VILLARÍN, M. C.; CHUNG, K.; SNYDER, S. Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 76, p. 118–31, 15 dez. 2013a.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, v. 59, p. 303–27, set. 2013b.

METCALF, J. S.; RICHER, R.; COX, P. a; CODD, G. a. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. **The Science of the total environment**, v. 421–422, p. 118–23, 1 abr. 2012.

MONTAG, L. F. de A.; FREITAS, T. M. da S.; RAIOL, R. D. de O.; SILVA, M. V. da. Length-weight relationship and reproduction of the guppy *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) in urban drainage channels in the Brazilian city of Belém Methods. **Biota Neotropical**, v. 11, n. 3, 2011.

MURILLO, P. D.; LORENZO, J.; MENDIOLA, R.; LUNA, B. S.; POSTGRADUADOS, C. De; VERACRUZ, C.; VERACRUZ-, K. C. F. **Revista de Biologia Tropical**. p. 1–7, 2014.

NDONG, M.; BIRD, D.; NGUYEN-QUANG, T.; DE BOUTRAY, M.-L.; ZAMYADI, A.; VINÇON-LEITE, B.; LEMAIRE, B. J.; PRÉVOST, M.; DORNER, S. Estimating the risk of cyanobacterial occurrence using an index integrating meteorological factors: Application to drinking water production. **Water research**, v. 56C, p. 98–108, 24 fev. 2014.

NEVO, Y.; NELSON, N. The NRAMP family of metal-ion transporters. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1763, n. 7, p. 609–20, jul. 2006.

NOGUEIRA, I. de S.; ARANTES, W.; JÚNIOR, G.; ALESSANDRO, E. B. D. Cianobactérias planctônicas de um lago artificial urbano na cidade de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 575–592, 2011.

NOGUEIRA, P. F. M.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T.; NOGUEIRA, M. M.; VIEIRA, A. A. H. The effects of *Anabaena spiroides* exopolysaccharides on copper accumulation in an aquatic food chain. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 93, n. 2–3, p. 125–30, 28 jun. 2009.

ODLARE, M. Introductory Chapter for Water Resources. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, p. 1–2, 2014.

OECD. Oecd guideline for testing of chemicals. n. July, p. 1–9, 1992.

OLIVEIRA, A. M. V. de. The perception of change : the records in the city of Goiás. **História (São Paulo)**, v. 30, n. 62, p. 189–208, 2011.

ORR, P. T.; JONES, G. J.; HUNTER, R. a; BERGER, K.; DE PAOLI, D. a; ORR, C. L. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 39, n. 12, p. 1847–54, dez. 2001.

OUDRA, B.; LOUDIKI, M.; SBIYYAA, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V.; NAMIKOSHI, N. Isolation , characterization and quanti ® cation of microcystins ( heptapeptides hepatotoxins ) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake ± reservoir ( Morocco ). v. 39, p. 1375–1381, 2001.

PAERL, H. W.; GARDNER, W. S.; HAVENS, K. E.; JOYNER, A. R.; MCCARTHY, M. J.; NEWELL, S. E.; QIN, B.; SCOTT, J. T. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted both by climate change and anthropogenic nutrients. **Harmful Algae**, v. 54, p. 213–222, 2016.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment international**, v. 30, n. 3, p. 357–62, maio 2004.

- PEREIRA, R. da S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20–36, 2004.
- PFLUGMACHER, S.; AMÉ, V.; WIEGAND, C.; STEINBERG, C. Cyanobacterial toxins and endotoxins - their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms. **Wasser & Boden**, v. 53, n. 4, p. 15–20, 2001.
- PIERINI, S. A.; THOMAZ, M. Review paper / Artigo de revisão Adaptações de plantas submersas à absorção do carbono inorgânico. **Acta Bot. Bras.** v. 18, n. 3, p. 629–641, 2004.
- PIMENTEL, J. S. M.; GIANI, A. Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1545–1554, 10 fev. 2013.
- PINHEIRO, J. O. O.; BELTRAN, E. C.; NEILAN, B. A. Geographical Segregation of the Neurotoxin-Producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4468–4474, 2000.
- PRASANNA, R.; KUMAR, R.; SOOD, A.; PRASANNA, B. M.; SINGH, P. K. Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. **Microbiological research**, v. 161, n. 3, p. 187–202, jan. 2006.
- QIAO, Q.; LIU, W.; WU, K.; SONG, T.; HU, J.; HUANG, X.; WEN, J.; CHEN, L.; ZHANG, X. Female zebrafish (*Danio rerio*) are more vulnerable than males to microcystin-LR exposure, without exhibiting estrogenic effects. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 142–143, p. 272–82, 15 out. 2013.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation research**, v. 312, n. 1, p. 17–24, fev. 1994.
- RAY, S.; KHILLARE, P. S.; AGARWAL, T.; SHRIDHAR, V. Assessment of PAHs in soil around the International Airport in Delhi, India. **Journal of hazardous materials**, v. 156, n. 1–3, p. 9–16, 15 ago. 2008.
- RIBALTA, C.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; SOLE, M. Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 176–183, 2015.
- RIFFAT, F. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **The Science of the total environment**, v. 346, n. 1–3, p. 256–73, 15 jul. 2005.

RODRÍGUEZ, V.; MOURA, S.; PINTO, E.; PEREIRA, C. M. P.; BRAGA, R. C. Aspectos Toxicológicos e Químicos da Anatoxina-a e seus Análogos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1365–1371, 2006.

SABATINI, S. E.; BRENA, B. M.; LUQUET, C. M.; SAN JULIÁN, M.; PIREZ, M.; CARMEN RÍOS DE MOLINA, M. Del. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis patagonicus* upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 5, p. 1188–94, jul. 2011.

SANCHES, S. M.; LEÃO, E.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água , impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 181–187, 2012.

SANCHES, S. M.; VIEIRA, E. M.; PRADO, E. L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Eclética Química**, v. 32, n. 4, p. 43–48, 2007.

SANTOS, K. R. de S.; SANT’ANA, C. L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“ salina ”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia , MS , Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, n. 1938, p. 61–83, 2010.

SANTOS, D. C. M. dos; MATTA, S. L. P. da; OLIVEIRA, J. A. de; SANTOS, J. A. D. dos. Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 64, n. 7–8, p. 861–6, nov. 2012.

SANTOS, H. B. dos; VIEIRA, L.; ALVES, S. N.; THOMÉ, R. G. Analysis of the small intestine of *Danio rerio* exposed to organophosphate and detergent: A histological and morphometric study. **Revista Conexão Ciência**, v. 11, n. 2, p. 51–58, 2016.

SCHMIDT, A. Sulfur Metabolism in Cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, v. 167, p. 572–583, 1988.

SCHMITT-JANSEN, M.; VEIT, U.; DUDEL, G.; ALTENBURGER, R. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, n. 4, p. 337–345, jul. 2008.

SHAMS, S.; CERASINO, L.; SALMASO, N.; DIETRICH, D. R. Experimental models of microcystin accumulation in *Daphnia magna* grazing on *Planktothrix rubescens*: implications for water management. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 148, p. 9–15, mar. 2014.

SHARBIDRE, A. a.; METKARI, V.; PATODE, P. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 132–141, out. 2011.

SILVA-STENICO, M. E.; LORENZI, A. S.; SILVA, C. S. P.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F. Inibidores De Proteases Produzidos Por Cianobactérias: Uma Revisão. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 183–209, jun. 2012.

SILVA-STENICO, M. E.; SILVA, C. S. P.; LORENZI, A. S.; SHISHIDO, T. K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S. P.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological research**, v. 166, n. 3, p. 161–75, 20 mar. 2011.

SILVA, E. M. da; GOMES, C. T. da S.; RAMOS, C. P. da S.; BRICIO, S. M. L. Occurrence of Cyanobacteria in Mundaú Reservoir , in Pernambuco State During January 2010 to November 2011. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1, n. 3, p. 35–42, 2013.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SINHORIN, V. D. G.; SINHORIN, A. P.; TEIXEIRA, J. M. D. S.; MILÉSKI, K. M. L.; HANSEN, P. C.; MOREIRA, P. S. A.; KAWASHITA, N. H.; BAVIERA, A. M.; LORO, V. L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 106, p. 181–7, ago. 2014.

SMITH, V. H. Low Nitrogen to Phosphorus Ratios Favor Dominance by Blue-Green Algae in Lake Phytoplankton. **Science**, v. 221, n. August, p. 669–671, 1983.

SOLÉ, M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C. An in vitro screening with emerging contaminants reveals inhibition of carboxylesterase activity in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 215–222, 2015.

STANIER, R. Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 225–274, 1977.

TAO, Y.; LI, W.; XUE, B.; ZHONG, J.; YAO, S.; WU, Q. Different effects of copper (II), cadmium (II) and phosphate on the sorption of phenanthrene on the biomass of cyanobacteria. **Journal of hazardous materials**, v. 261, p. 21–8, 15 out. 2013.

TARAZONA, J. V. Ecotoxicology. **Encyclopedia of Toxicology**, n. 3, p. 276–280, 2014.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TRAN, T. H.; PHAM, D. T.; HOANG, V. L.; NGUYEN, H. P. Water pollution estimation based on the 2D transport–diffusion model and the Singular Evolutive Interpolated Kalman filter. **Comptes Rendus Mécanique**, v. 342, n. 2, p. 106–124, fev. 2014.

TRAVEN, L. Sources, trends and ecotoxicological risks of PAH pollution in surface sediments from the northern Adriatic Sea (Croatia). **Marine pollution bulletin**, v. 77, n. 1–2, p. 445–50, 15 dez. 2013.

UYANIKGIL, Y.; YALÇINKAYA, M.; ATEŞ, U.; BAKA, M.; KARAKIŞI, H. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid formulation on medulla spinalis of *Poecilia reticulata*: a histopathological study. **Chemosphere**, v. 76, n. 10, p. 1386–91, set. 2009.

VALE, E.; PEREIRA, P.; LISBOA, U. De; BIODIVERSIDADE, C. De. Multiplex PCR for Detection of Microcystins-Producing Cyanobacteria from Freshwater Samples. **Environmental Toxicology**, p. 1–10, 2009.

VASYLKIV, O. Y.; KUBRAK, O. I.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 1, p. 1–5, 2011.

VILLARROEL, M. J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 53, n. 8, p. 857–64, dez. 2003.

VITTOZZI, L.; ANGELIS, G. De. A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 167–204, 1991.

VOGL, C.; GRILLITSCH, B.; WYTEK, R.; SPIESER, O. H.; SCHOLZ, W. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 2736–2742, 1999.

WANG, S.; HUANG, G. H. An integrated approach for water resources decision making under interactive and compound uncertainties. **Omega**, v. 44, p. 32–40, abr. 2014.

WELKER, M.; MARSÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L.; VON DÖHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2090–103, set. 2006.

WERT, E. C.; KORAK, J. A.; TRENHOLM, R. A.; ROSARIO-ORTIZ, F. L. Effect of oxidant exposure on the release of intracellular microcystin, MIB, and geosmin from three cyanobacteria species. **Water research**, v. 52, p. 251–9, 1 abr. 2014.

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. Histopathological study of *Poecilia reticulata* ( guppy ) after long-term exposure to bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride. **Aquatic Toxicology**, v. 10, p. 143–165, 1987.

WILGES, L.; BROOCK, D.; CARNEIRO, T.; PEREIRA, B.; BARBIERI, M.; AZEVEDO, D.; KONRAD, S.; CASTRO, J. De; SARKIS, J.; DENISE, C.; REIS, M. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebra fish (*Danio rerio*) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, n. 2, p. 247–252, 2012.

WOOD, S. a; HEATH, M. W.; HOLLAND, P. T.; MUNDAY, R.; MCGREGOR, G. B.; RYAN, K. G. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 4, p. 897–903, 1 abr. 2010.

WU, J.; SHAO, S.; ZHOU, F.; WEN, S.; CHEN, F.; HAN, X. Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 1–6, jan. 2014.

YAN, Z.; YANG, X.; LU, G.; LIU, J.; XIE, Z.; WU, D. Potential environmental implications of emerging organic contaminants in Taihu Lake, China: comparison of two ecotoxicological assessment approaches. **The Science of the total environment**, v. 470–471, p. 171–9, 1 fev. 2014.

ZAPATA, L. M.; BOCK, B. C.; YANETH, L.; PALACIO, J. A. Ecotoxicology and Environmental Safety Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 108–116, 2016.

ZAPOMELOVÁ, E.; JEZBEROVÁ, J.; HROUZEK, P.; HISEM, D.; REHÁKOVA, K.; KOMÁRKOVÁ, J. Polyphasic Characterization of Three Strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and Their Reclassification To Sphaerospermum Gen. Nov. (Incl. *Anabaena kisseleviana*). **Journal of Phycology**, v. 46, n. 2, p. 415–415, abr. 2010.

ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutation research**, v. 727, n. 1–2, p. 16–41, 2011.

ZHANG, S.; WANG, Y.; HE, W.; WU, M.; XING, M.; YANG, J.; GAO, N.; PAN, M. Impacts of temperature and nitrifying community on nitrification kinetics in a moving-bed biofilm reactor treating polluted raw water. **Chemical Engineering Journal**, v. 236, p. 242–250, jan. 2014.

ZHANG, W.; LIU, W.; ZHANG, J.; ZHAO, H.; ZHANG, Y.; QUAN, X.; JIN, Y. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 24, n. 11, p. 2019–2027, 2012.

ZIKOVÁ, A.; LORENZ, C.; LUTZ, I.; PFLUGMACHER, S.; KLOAS, W. Physiological responses of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to cyanobacterial biomass containing microcystin-LR. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 128–129, p. 25–33, 15 mar. 2013.



## ANEXO




---

 Documento de aprovação da comissão de ética no uso de animais
 

---



MEMO CEP/HC/UFG n. 071/2012

Goiânia, 08/01/2013

Ref. Relatório de andamento ou conclusão de pesquisa

**Do: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás**

Prof<sup>o</sup> Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais  
Senhor (a) Pesquisador (a),

Pelo presente vimos solicitar com urgência, relatório detalhado do andamento da pesquisa sob sua coordenação ou comunicado da data do encerramento do estudo, protocolado neste CEP/HC/UFG sob o número **046/2010** intitulado: *“Avaliação da ação aguda e crônica do glifosato e intoxicantes naturais em organismos aquáticos de clima tropical: Poecilia sp. como modelo experimental de biomonitoramento”*

Solicitamos especial rigor na apresentação dos relatórios e que os mesmos sejam consubstanciados, digitados, assinados e datados, constando todas as informações necessárias, conforme modelo que consta na página deste Hospital: [www.hc.ufg.br](http://www.hc.ufg.br).

Informamos que o não atendimento a solicitação, implicará na imediata suspensão da supra citada pesquisa e comunicado à CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,

  
**Farm. José Mário Coelho Moraes**  
Coordenador do CEP-HC/UFG.



## APÊNDICE



### Tabela de padrões etológicos reacionais

Observações Realizadas Durante 10 minutos/aquário

Modelo Reacional	Alterações Comportamentais	Categoria
<b>Distúrbios Respiratórios – Dispnéia (A)</b>		
	Respiração na Superfície da Água	A1
	Agrupamento ao Redor da Bomba de Aeração	A2
	Aumento da Frequência de Batimento Opercular	A3
	Natação Longitudinal	A4
<b>Distúrbios Natatórios – (B)</b>		
	Ataxia ou Distaxia (Movimentos Descoordenados)	B1
	Tremores	B2
	Letargia (Natação Lenta)	B3
	Hiperatividade (Natação Muito Rápida)	B4
<b>Distúrbios Tegumentares – (C)</b>		
	Escurecimento das nadadeiras	C1
	Escurecimento corporal	C2
	Escamas eriçadas	C3
	Midríase	C4
<b>Distúrbios Sociais – (D)</b>		
	Canibalismo	D1
	Lepdofagia	D2
	Agressividade (Ataque a outros espécimes)	D3
	Falta de Interesse Pela Fêmea	D4



## APÊNDICE



### Método para cultivo de larvas de *Drosophila melanogaster*

#### (PARTE I)

O cultivo de moscas e larvas de *Drosophila melanogaster* foi realizado a partir de linhagens cedidas pelo Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese do Instituto de Ciências Biológicas (ICB I) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Inicialmente, as moscas adultas de *D. melanogaster* foram repicadas, propagadas e mantidas em frascos de cultura contendo meio banana-ágar, todos armazenados a temperatura de  $25 \pm 2$  °C sob um fotoperíodo de 12h de fotofase e 12h de escotofase.

Espécies do gênero *Drosophila* possuem um ciclo de vida de oito dias que é dividido em quatro estágios morfológicamente e metabolicamente distintos, sendo eles o de ovo, larva, pupa e mosca. Após a fertilização do ovo, o embrião se desenvolve em aproximadamente um dia (25 °C) passando para o primeiro estágio larval onde a larva se alimenta - preferencialmente de leveduras - e cresce passando por três mudas, uma por dia, tendo a formação de pupas no quarto dia, sendo que do quinto ao oitavo dia ocorre a sua metamorfose na mosca adulta.

Na alimentação de moscas e larvas de *Drosophila* as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen, 1838) são comumente utilizadas em meios de cultura por serem uma importante fonte de nutrientes, proporcionando assim elevadas taxas de crescimento larval e de sobrevivência das moscas. Dietas mistas com leveduras conferem benefícios aos espécimes de *D. melanogaster*, principalmente, quando as larvas se encontram no fim do período de desenvolvimento (terceiro estágio larval) possuindo assim elevadas exigências nutricionais devido ao preparo para a fase de pupa.

Para a manutenção do estoque de *D. melanogaster* 50 frascos de vidro transparentes e estéreis foram previamente aquecidos em estufa a 100 °C por um período de 10 minutos, sendo posteriormente acrescidos de uma alíquota de 30 mL de meio banana-ágar processado e homogeneizado à 80 °C (15g de levedura ativada metabolicamente com 10g de sacarose, 30g de agar powder, 2g de Nipagin, 800g de banana e 1L de água destilada. Após a adição do meio banana-ágar aos frascos, estes foram secos em estufa a 80 °C por um período de 15 minutos e posteriormente armazenados a temperatura de 25 °C por período *overnight* para que quando as

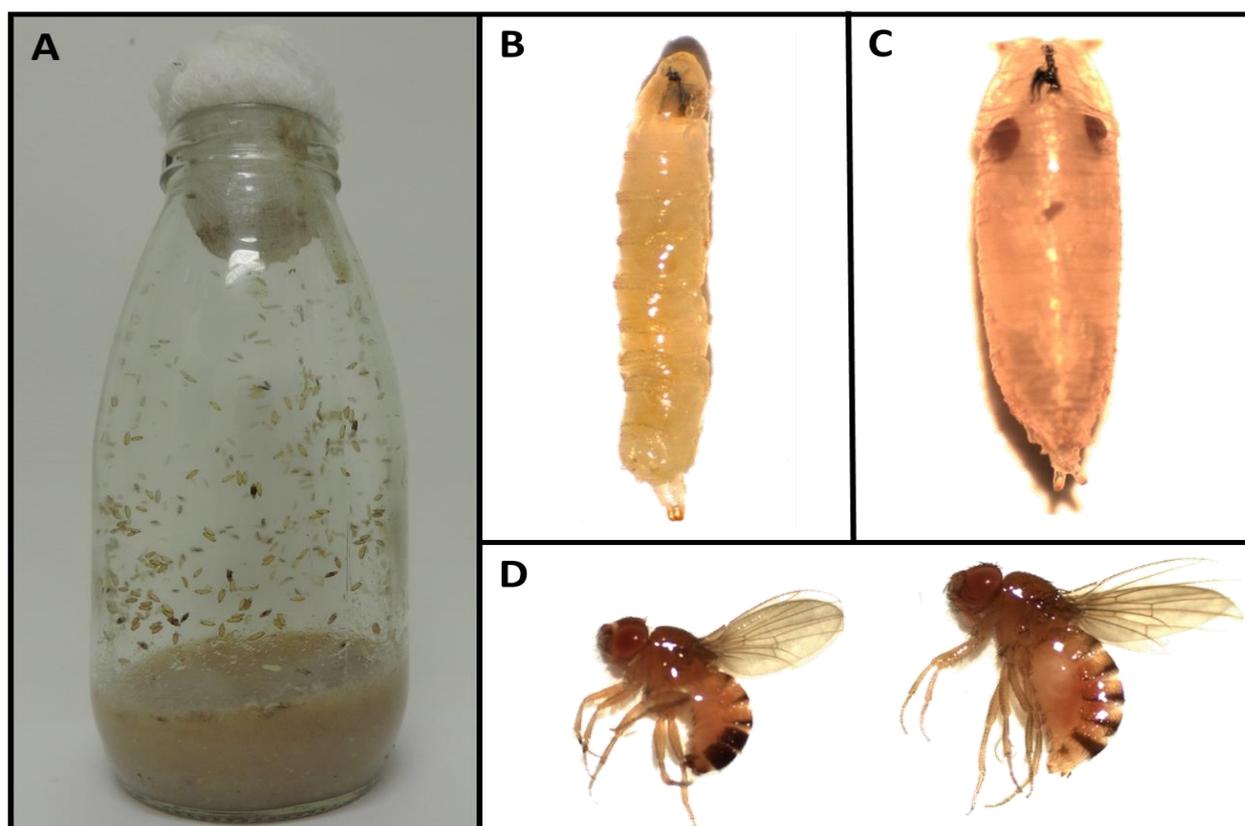
---

Método para cultivo de larvas de *Drosophila melanogaster*

(PARTE II)

moscas fossem depositadas nos frascos, estas não ficassem aderidas ao vidro devido a presença de água residual do meio banana-ágar.

No preparo do meio banana-ágar, este deve ser consistente o suficiente para que as moscas não fiquem aderidas a ele, entretanto, deve possibilitar que as larvas se locomovam livremente em seu interior. Os frascos de cultivo devem ser vedados com espuma ou tecido de algodão (gaze) para evitar que as moscas que escapem e também para manter o meio livre de ácaros e outros contaminantes (Figura 22). Tipicamente, quando não se deseja obter mais larvas, os estoques de moscas são mantidos a  $12 \pm 2$  °C, pois a essa temperatura é reduzida a atividade metabólica dos animais, e assim o ciclo de vida pode ser prolongado por até 28 dias.



**Figura 22.** Cultivo de larvas e moscas de *Drosophila melanogaster*. (A) frasco de cultivo de moscas contendo meio banana-ágar, larvas em diferentes estágios e pupas aderidas a parede do vidro (B) terceiro estágio larval; (C) fase de pupa; (D) a esquerda uma mosca adulta macho e a direita uma mosca adulta fêmea.



## APÊNDICE



### Método para cultivo de larvas de *Drosophila melanogaster*

#### (PARTE III)

Para o preparo do meio de oviposição e eclosão as cepas de *S. cerevisiae* de linhagem de panificação (Fleischmann®) foram mantidas armazenadas sob refrigeração a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do preparo do meio-levedura (oviposição e eclosão) para moscas de *D. melanogaster*. No preparo do meio-levedura 500g de *S. cerevisiae* foram transferidas para um becker de 500 mL e incubadas em banho-maria a temperatura de  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sob constante homogeneização, até a sua pré-ativação metabólica ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Para a fase de ativação da cepa, esta foi submetida ao processo de fermentação por meio da homogeneização de 500g de *S. cerevisiae* (pré-ativada) com 30 mL de solução de sacarose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ) a  $1,168\text{mol.L}^{-1}$ , sendo o meio mantido sob repouso por um período de 15 minutos.

Após o preparo do meio-levedura, este foi distribuído em 25 frascos de vidro, transparentes, de 150 mL de volume e com boca de 3 cm de diâmetro, perfazendo o tal de 30mL de meio-levedura por frasco de cultura. Indivíduos machos e fêmeas de *D. melanogaster* foram transferidos para os frascos de cultura contendo meio-levedura sendo mantidos à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Após 96h de oviposição, as moscas foram retiradas do meio, acoplado-se um funil de plástico ao frasco de vidro, vertendo e agitando-o vigorosamente até a completa retirada das moscas, remanescendo assim somente os ovos (para eclosão) e larvas recém eclodidas.

Após 72h do início da eclosão (terceiro estágio larval) as larvas foram ressuspensas em 250 mL de água destilada, vertidas e filtradas em papel filtro acoplado ao funil, e aliqüotadas com pipetas Pasteur em tubos de ensaio de 10 mL para posterior armazenamento sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.



## APÊNDICE

### Método para cultivo de náuplios de *Artemia salina*

#### (PARTE I)



O gênero *Artemia* compreende um táxon cosmopolita com linhagens gonocóricas (dioicas) e partenogênicas sendo restrito a habitats salinos, como mares, alguns pântanos, lagos e terras salobras. Independentemente do tipo de linhagem, após reprodução, as artêmias produzem cistos bicôncavos, que são metabolicamente inativos e apresentam baixa densidade, assim, se distribuem na face superior da lâmina d'água do corpo hídrico onde habitam. Após imersão em água salobra, os cistos se hidratam, tornando-se esféricos e retomando suas atividades metabólicas. O ciclo de vida da *Artemia salina* dura aproximadamente quatorze dias, sendo que, após a fase de náuplio, seguem-se as fases morfológicas de metanáuplio I, II, III e IV, juvenil e adulto.

A casca dos cistos é composta pela membrana externa, córion (Figura 6B), membrana cuticular externa e a membrana cuticular embrionária. O córion é uma estrutura rígida de revestimento que apresenta lipoproteínas, quitina e hematina em sua composição, proporcionando assim proteção aos embriões contra rupturas mecânicas. A membrana cuticular externa impede a passagem de grandes moléculas para o interior do cisto, atuando na diminuição da permeabilidade de substâncias até o embrião. Já a membrana cuticular embrionária é um envoltório transparente e altamente flexível que se transforma na membrana de eclosão durante o processo de incubação dos cistos para a eclosão dos náuplios.

Dentre os diferentes estágios do ciclo de vida, o primeiro estágio larval (náuplio) é uma excelente fonte de nutrientes para a maioria dos peixes, entretanto, se os cistos remanescentes da eclosão não forem separados dos náuplios, estes, podem causar problemas gastrointestinais aos peixes devido a associação de esporos de bactérias e fungos com a superfície externa do cisto - o córion.

Outra importância na utilização dos náuplios de artêmia para a alimentação de peixes é devido a sua característica de apresentar derivados de B-caroteno disponíveis nos cistos, aumentando assim a seu valor nutricional. A disponibilidade e qualidade dos alimentos possuem efeitos comprovados sobre o tamanho e cor dos machos de *P. reticulata* proporcionando um maior sucesso reprodutivo mediado pelo aumento da coloração alaranjada em adultos do sexo masculino.



## APÊNDICE



### Método para cultivo de náuplios de *Artemia salina*

#### (PARTE II)

Atualmente, *Artemia salina* é o microcrustáceo mais utilizado como alimento vivo para peixes, sendo a importância do seu valor nutricional atribuída a elevada fonte de nutrientes, incluindo aminoácidos essenciais e alguns ácidos graxos insaturados como o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosa-hexanóico, que são importantes para o desenvolvimento neural dos peixes.

Assim, de acordo com as características morfológicas e fisiológicas dos cistos, para a obtenção de náuplios de *Artemia salina* estes foram previamente hidratados em cálice graduado contendo 500 mL de solução de hidratação (17,5g de NaCl e 5g de NaHCO<sub>3</sub>) na densidade de 2,5g de cisto para cada 500 mL de solução a temperatura de 25 ± 1 °C por um período de 2h, sendo mantidos sob constante oxigenação com o auxílio de um compressor de ar acoplado a pedra difusora.

Para que ocorra o rompimento do córion o embrião gasta muita energia – disponível no vitelo – eclodindo náuplios com pouca ou nenhuma reserva nutritiva, assim, emprega-se a técnica de descapsulação com hipoclorito de sódio (NaClO) para a oxidação do córion, conservando os macronutrientes que se encontram no vitelo dos náuplios.

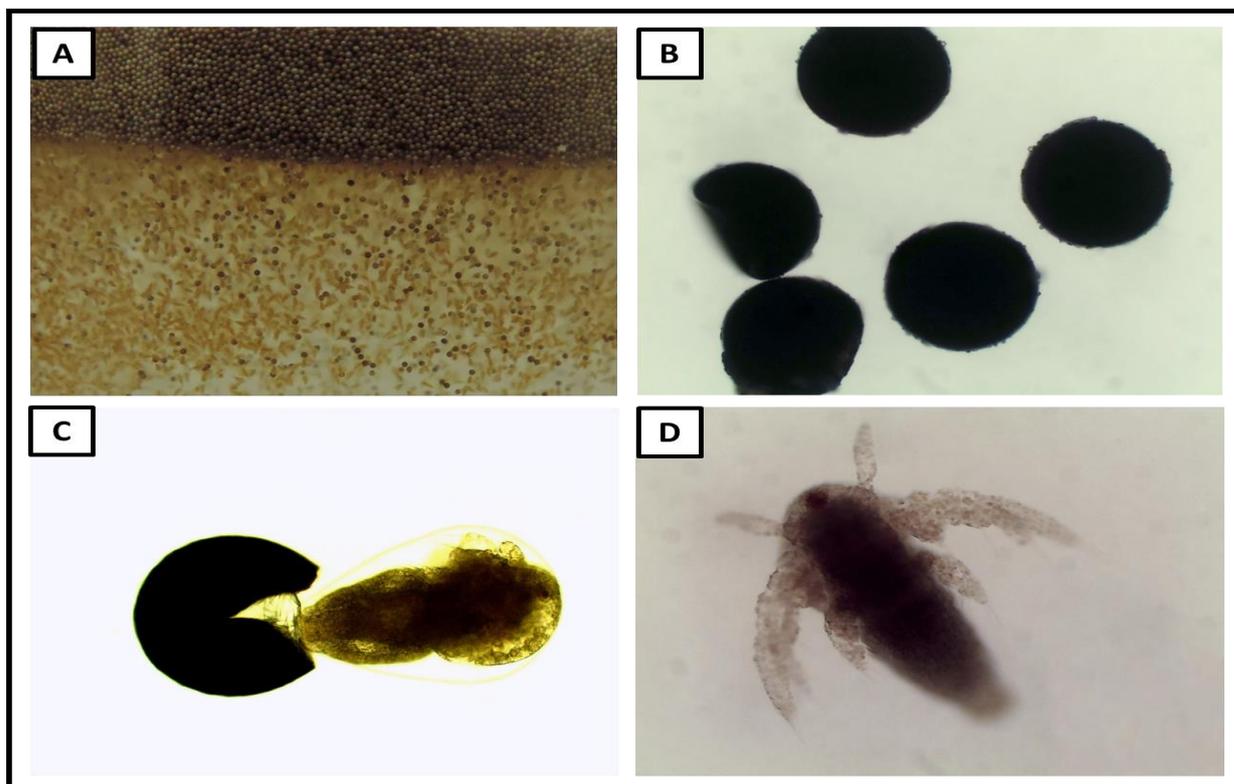
Para isso, os cistos filtrados após a fase de hidratação foram dispostos em um cálice graduado contendo 500 mL de solução de descapsulação (17,5g de NaCl, 5g de NaHCO<sub>3</sub> e 25 mL de NaClO) a temperatura de 25 ± 1 °C, sendo a solução com os cistos mantidos sob constante oxigenação, com bomba compressora de ar, por um período de 10 minutos, até que ocorresse o rompimento dos cistos caracterizado pela mudança de cor da solução de marrom para alaranjado. Logo após, os cistos descapsulados foram concentrados em papel filtro e submetidos a lavagens sucessivas em água destilada para a remoção dos resíduos de hipoclorito de sódio.

Posteriormente os cistos foram neutralizados, por um período de 10 minutos, com 500 mL solução de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) a 5%, sob constante oxigenação com bomba compressora de ar, para a retirada de resíduos de NaClO, concentrados em papel filtro e submetidos a lavagens sucessivas em água destilada para a remoção dos resíduos de ácido acético.

---

**Método para cultivo de náuplios de *Artemia salina***
**(PARTE III)**

Após o processo de neutralização os cistos foram incubados em cálice de vidro graduado contendo 500 mL de solução para eclosão (17,5g de NaCl e 5g de NaHCO<sub>3</sub>) a temperatura de 25 ± 1 °C e pH de 8,16 sendo mantidos sob forte oxigenação com o auxílio de uma pedra difusora acoplada a um compressor de ar, de modo que, sob estas condições, o tempo requerido para eclosão foi de aproximadamente 35h. Após eclosão (Figura 23C), os náuplios (Figura 23D) foram novamente filtrados, lavados, sedimentados em proveta e ressuspensos em água destilada para posterior armazenamento sob refrigeração a temperatura de 4°C.



**Figura 23.** Cistos e náuplios de *Artemia salina* obtidos em diferentes fases de cultivo. (A) Solução de eclosão contendo cistos hidratados na fase superior e náuplios recém eclodidos na fase inferior; (B) cistos não hidratados caracterizados morfologicamente por possuírem superfície côncava; (C) Processo de descapsulação dos cistos evidenciado pelo rompimento do córion; (D) náuplio de *Artemia salina* caracterizado morfologicamente pela presença de três apêndices corporais.



## APÊNDICE



### Coloração pelo Método de MOWRY (1958, Modificado) de Ferro Coloidal para Mucopolissacarídeos (Azul da Prússia)

#### MÉTODO / PROCEDIMENTO

Estufa (70°C) -----	20 minutos
Xilol [100%] -----	05 minutos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Água Corrente -----	03 mergulhos
Ácido Acético [12%] -----	03 minutos
Solução de Ferro Coloidal de Muller (Uso) -----	60 minutos
Ácido Acético [12%] -----	03 minutos
Ácido Acético [12%] -----	03 minutos
Ácido Acético [12%] -----	03 minutos
Ácido Acético [12%] -----	03 minutos
Solução Ácida de Ferrocianeto de Potássio (Uso) -----	20 minutos
Água Corrente -----	05 minutos
Água Destilada -----	01 mergulho
Eosina -----	02 minutos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Xilol [100%] -----	20 mergulhos
Xilol [100%] -----	20 mergulhos
Montar	

**RESULTADO:** Mucopolissacarídeos Ácidos e Mucina Epitelial Ácida são marcados na coloração azul “intenso” (Azul da Prússia)



## APÊNDICE




---

### Coloração pelo Método de MOWRY (1958, Modificado) de Ferro Coloidal para Mucopolissacarídeos (Azul da Prússia)

#### SOLUÇÕES (PARTE I)

##### Ácido Acético [12%]

Ácido Acético Glacial (M.M. = 60,05g.mol <sup>-1</sup> ) .....	12mL
Água Destilada .....	88mL

##### Solução de Ferro Coloidal de Muller (Uso)

*Solução de Ferro Coloidal de Muller (Estoque) .....	10mL
Ácido Acético Glacial (M.M. = 60,05g.mol <sup>-1</sup> ) .....	2,5mL
Água Destilada .....	7,5mL

---

##### \*Solução de Ferro Coloidal de Muller (Estoque)

Cloreto Férrico Hexahidratado (M.M. = 270,30g.mol <sup>-1</sup> ) .....	14,5g
Água Destilada .....	50mL

Ferver 250mL de água destilada, adicionar 4,4mL da solução de Cloreto Férrico Hexahidratado e homogeneizar. Repete-se a fervura da solução até que esta fique com uma coloração vermelho escuro (aproximadamente 01 minuto), em seguida, retira-se a solução do aquecimento a deixando esfriar à temperatura ambiente. Armazena-se em frasco do tipo âmbar.

---



## APÊNDICE



### Coloração pelo Método de MOWRY (1958, Modificado) de Ferro Coloidal para Mucopolissacarídeos (Azul da Prússia)

#### SOLUÇÕES (PARTE II)

##### Solução Ácida de Ferrocianeto de Potássio (Uso)

**Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado [5%]	10mL
***Ácido Clorídrico [1,85%]	10mL

##### \*\*Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado [5%]

Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado (M.M. = $422,39\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	5g
Água Destilada	100mL

##### \*\*\*Ácido Clorídrico [1,8%]

Ácido Clorídrico (M.M. = $36,46\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	5g
Água Destilada	95mL

##### Eosina [0,1%]

Eosina Amarelada (M.M. = $691,96\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	0,1g
Etanol [100%] (M.M. = $46,07\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	99,5mL
Ácido Acético Glacial (M.M. = $60,05\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	5mL



## APÊNDICE



### Coloração pelo Método de PERLS para Cobre

#### MÉTODO / PROCEDIMENTO

Estufa (70°C) -----	20 minutos
Xilol [100%] -----	05 minutos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Água Corrente -----	03 mergulhos
Solução de Coloração (Ferrocianeto de Potássio Acidificado) -----	60 minutos
Água Destilada -----	03 mergulhos
Verde Luz [0,2%] -----	30 segundos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Etanol [100%] -----	10 mergulhos
Xilol [100%] -----	20 mergulhos
Xilol [100%] -----	20 mergulhos
Montar	

**RESULTADO:** Regiões teciduais que apresentam depósito de cobre ficam com coloração avermelhada enquanto o restante do tecido e contracorado de verde claro.



## APÊNDICE



### Coloração pelo Método de PERLS para Cobre

#### SOLUÇÕES

#### Solução de Coloração (Ferrocianeto de Potássio Acidificado)

*Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado [2%] .....	10mL
**Ácido Clorídrico [0,76%] .....	10mL

#### \*Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado [2%]

Ferrocianeto de Potássio Tri-hidratado (M.M = 422,39g.mol <sup>-1</sup> ) .....	2g
Água Destilada .....	100mL

#### \*\*Ácido Clorídrico [0,76%]

Ácido Clorídrico (M.M = 36,46g.mol <sup>-1</sup> ) .....	2mL
Água Destilada .....	98mL

#### Verde Luz [0,2%]

Verde Luz Amarelado (M.M. = 749,89g.mol <sup>-1</sup> ) .....	0,2g
Ácido Acético (M.M. = 60,05g.mol <sup>-1</sup> ) .....	200µL
Água Destilada .....	100mL



## APÊNDICE



### Ensaio Cometa - *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

#### MÉTODO / PROCEDIMENTO

1. Adicionar 120 $\mu$ L de **Agarose de Baixo Ponto de Fusão - *Low Melting Point* (0,5%)**, tamponada com **PBS (pH = 7,4)**, à 10 $\mu$ L da suspensão celular, obtida pela homogeneização com soro fetal bovino na proporção de 1:4 (v/v).
2. Adicionar o homogeneizado com agarose sobre lâminas pré-cobertas com **Agarose Normal - *Normal Melting Agarose* (1,5%)**, cobrir com lamínula e manter sob refrigeração até a completa solidificação da agarose – aproximadamente 20 (vinte) minutos.
3. Retirar as lamínulas, cuidadosamente, apenas com movimentos horizontais.
4. Colocar as lâminas na **Solução de Lise** e manter sob refrigeração por um período de 24 (vinte e quatro) horas. OBS: Caso necessário, as lâminas podem permanecer na solução de lise por até 4 (quatro) semanas. Caso ocorra precipitação da solução de lise, as lâminas podem ser lavadas, cuidadosamente e sem quaisquer movimentos bruscos, com PBS (pH = 7,4) antes da etapa seguinte.
5. Após a lise, colocar as lâminas em cuba de eletroforese horizontal, imersa em recipiente isolante térmico contendo gelo, e adicionar o **Tampão de Eletroforese** sobre a cuba até que as lâminas fiquem com uma “fina camada superficial” do tampão de eletroforese sobre elas. Importante: A adição do tampão de eletroforese deve ser realizada lentamente sem verter a solução diretamente sobre as lâminas. Caso a cuba não apresente todos os espaços preenchidos com lâminas, deve-se completar, previamente, esses espaços utilizando lâminas limpas.
6. Deixar o DNA das células desnaturando no tampão de eletroforese (alcalino) por um período de 30 (trinta) minutos à temperatura de 4°C.
7. Iniciar a corrida eletroforética com uma corrente elétrica de 1V.cm<sup>-1</sup> a 300 mA durante 25 minutos – isso corresponde a 25V em uma cuba horizontal de eletroforese de 25 cm.
8. Após a eletroforese, cuidadosamente, retiram-se as lâminas e as neutraliza com a solução **Tampão de Neutralização** - três séries de 5 (cinco) minutos de cada.
9. Em seguida, as lâminas devem ser secas, sob inclinação por 24 horas, e fixadas por 5 (cinco) minutos em etanol absoluto. Caso necessário devem ser estocadas sob refrigeração à 4°C.
10. Para a “coloração” deve-se adicionar 25 $\mu$ L da solução de **Brometo de Etídio (50 $\mu$ M)** sobre a lâmina e a cobrir com lamínula em toda extensão que contenha a agarose e a amostra biológica.



## APÊNDICE



### Ensaio Cometa - *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

#### SOLUÇÕES (PARTE I)

##### Agarose de Baixo Ponto de Fusão - *Low Melting Point Agarose* (0,5%)

Low Melting Point Agarose ..... 0,1g

<sup>1</sup>Phosphate Buffered Saline (PBS) ..... 20mL

Observações: a) dissolver muito bem a agarose; b) colocar a solução homogeneizada para aquecer até que se inicie o processo de ebulição; c) repetir a etapa b) até que a agarose esteja completamente diluída; d) completar o volume da solução com PBS, caso tenha vaporizado, homogeneizar e levar ao banho-maria a 37°C. Ressalta-se a importância de esperar que essa solução chegue a temperatura referida anteriormente para que não cause danos as células, e à integridade do DNA, devido ao superaquecimento.

##### \*Tampão Fosfato-Salino - *Phosphate Buffered Saline* (PBS)

Cloreto de Potássio (M.M. = 74,55g.mol<sup>-1</sup>) ..... 0,2g

Fosfato de Potássio Monobásico (M.M. = 136,09g.mol<sup>-1</sup>) ..... 0,2g

Cloreto de Sódio (M.M. = 58,44g.mol<sup>-1</sup>) ..... 8g

Hidrogenofosfato Dissódico Anidro (M.M. = 141,96g.mol<sup>-1</sup>) ..... 1,15g

Água Destilada ..... 1000mL

Observação: Corrigir o pH para 7,4 e armazenar sob refrigeração a 4°C

##### Agarose Normal - *Normal Melting Agarose* (1,5%)

*Normal Melting Agarose* ..... 1,5g

<sup>1</sup>Phosphate Buffered Saline (PBS) ..... 100mL

Observações: a) Homogeneizar muito bem por um período de aproximadamente 60 (sessenta) minutos; b) aquecer a solução somente até o início do processo de ebulição e em seguida homogeneizar; c) deixar solidificar à temperatura ambiente; d) após solidificação, fragmentar o gel em segmentos relativamente pequenos e repetir as etapas b), c) e d) por mais três vezes - ao final deve-se completar o volume de tampão (PBS) que vaporiza com esse processo; e) levar a agarose para o banho-maria a temperatura de 80°C, de modo que a água se mantenha no mesmo



## APÊNDICE



### Ensaio Cometa - *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

#### SOLUÇÕES (PARTE II)

nível que a superfície da agarose; f) mergulhar as lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas, na agarose até que o gel alcance a região fosca das lâminas; g) assim que retirar a lâmina de vidro do gel de agarose deve-se limpar o lado oposto a parte fosca com uma folha de papel; h) secar as lâminas por um período de 24 (vinte e quatro) horas mantendo-as em posição horizontal e a temperatura ambiente.

---

#### **Solução de Lise – Uso (NaCl a 2,22M; EDTA a 89 mM; Tris a 8,9 mM; NaOH a 0,2 M; Lauril Sarcosinato de Sódio a 34mM; Triton X-100 a 16,53 mM e DMSO a 1,4M)**

Triton X-100 (M.M. = 646,37g.mol <sup>-1</sup> ) .....	1mL
Dimetilsulfóxido- DMSO (M.M. = 78,13g.mol <sup>-1</sup> ) .....	10mL
<sup>2</sup> Solução de Lise (Estoque) .....	89mL

Observações: A solução de lise (uso) deve ser preparada somente no momento do uso, devendo ser sempre mantida ao abrigo da luz. Antes de utiliza-la recomenda-se que a deixe em repouso, por aproximadamente 60 (sessenta) minutos, sob refrigeração a uma temperatura de 4°C. Uma cubeta de vidro comporta aproximadamente 100 (cem) mililitros da solução de lise.

---

#### <sup>2</sup>Solução de Lise (Estoque)

Cloreto de Sódio (M.M. = 58,44g.mol <sup>-1</sup> ) .....	146,1g
Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Di-hidratado (M.M. = 372,24g.mol <sup>-1</sup> ) .....	37,2g
Tris(hidroximetil)aminometano (M.M. = 121,12g.mol <sup>-1</sup> ) .....	1,2g
Hidróxido de Sódio (M.M. = 39,997g.mol <sup>-1</sup> ) .....	8g
Água Destilada .....	q.s.p. 1000mL

Observação: Após completa homogeneização dessa solução, deve-se corrigir o pH (pH = 10)

Lauril Sarcosinato de Sódio .....	10g
-----------------------------------	-----

Observação: Deve-se adicionar o Lauril lentamente, e após a sua adição à solução deve ser homogeneizada de mesmo modo, bem lentamente, para evitar a formação de espuma e de grumos. Todos os procedimentos de homogeneização são realizados sem o aquecimento da solução. Ao



## APÊNDICE



### Ensaio Cometa - *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

#### SOLUÇÕES (PARTE III)

final do preparo espera-se obter uma solução de aspecto translúcido. Verificar o pH e se necessário corrigir (pH = 10). Essa solução deve ser estocada ao abrigo da luz, em frascos do tipo âmbar, e a temperatura ambiente.

#### Tampão de Eletroforese (NaOH a 8,69mM; EDTA a 0,96mM; pH=13)

<sup>3</sup>Solução Estoque do Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético - EDTA ..... 9mL

<sup>4</sup>Solução Estoque do Hidróxido de Sódio ..... 54mL

Água Destilada (Gelada) ..... 1800mL

Observação: Fazer essa solução somente no momento do uso e corrigir o pH para 13 e armazenar sob refrigeração a 4°C. No momento da eletroforese, a intensidade da corrente elétrica ('amperagem') e a tensão elétrica ou DDP ('voltagem') devem ser ajustadas acrescentando e retirando pequenos volumes do tampão de eletroforese.

<sup>3</sup>Solução Estoque do Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético – EDTA [200mM]

Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético Di-hidratado (M.M. = 372,24g.mol<sup>-1</sup>) ..... 14,89g

Água Destilada ..... 200mL

Observação: Após completa homogeneização deve-se fazer a correção do pH (pH = 10)

<sup>4</sup>Solução Estoque do Hidróxido de Sódio [300mM]

Hidróxido de Sódio (M.M. = 39,997g.mol<sup>-1</sup>) ..... 21,6g

Água Destilada ..... 54mL

#### Tampão de Neutralização (Tris 0,42 M, pH 7,5)

Tris(hidroximetil)aminometano (M.M. = 121,12g.mol<sup>-1</sup>) ..... 24,25g

Água Destilada ..... qsp 500mL

Observações: a) corrigir o pH para 7,5 com solução de HCl; b) estocar em temperatura ambiente; c) esta solução é muito propícia ao aparecimento de fungos



## APÊNDICE




---

### Ensaio Cometa - *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

#### SOLUÇÕES (PARTE IV)

##### **Brometo de Etídio - Uso [50 $\mu$ M]**

<sup>5</sup> Brometo de Etídio – Estoque [0,5mM] .....	1mL
Água Destilada .....	9mL

---

##### <sup>5</sup>Brometo de Etídio - Estoque [0,5Mm]

Brometo de Etídio (M.M. = 394,294g.mol <sup>-1</sup> ) .....	10mg
Água Destilada .....	50mL

---