



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NICHOLAS ALEXANDRE ALVES PERNAMBUCO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA MACRÓFITA *PISTIA*
STRATIOTES EM ATENUAR OS EFEITOS GENOTÓXICOS E
FISIOLÓGICOS DO COBRE PARA O TELEÓSTEO
*PROCHILODUS LINEATUS***

Londrina
2022

NICHOLAS ALEXANDRE ALVES PERNAMBUCO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA MACRÓFITA *PISTIA STRATIOTES* EM ATENUAR OS EFEITOS GENOTÓXICOS E FISIOLÓGICOS DO COBRE PARA O TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia dos Reis Martinez

Londrina
2022

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

Pernambuco, Nicholas Alexandre Alves .

Avaliação do potencial da macrófita *Pistia stratiotes* em atenuar os efeitos genotóxicos e fisiológicos do cobre para o teleósteo *Prochilodus lineatus* / Nicholas Alexandre Alves Pernambuco. - Londrina, 2022.
75 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno Dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Ecotoxicologia - Tese. 2. Fitorremediação - Tese. 3. Danos no DNA - Tese. 4. Ionorregulação - Tese. I. Martinez, Claudia Bueno Dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

NICHOLAS ALEXANDRE ALVES PERNAMBUCO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA MACRÓFITA *PISTIA STRATIOTES* EM ATENUAR OS EFEITOS GENOTÓXICOS E FISIOLÓGICOS DO COBRE PARA O TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Marta Marques de Souza
FURG

Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de agosto de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Claudia Bueno dos Reis Martinez, pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste projeto, pelo incentivo, auxílio e por me permitir o prazer de ser seu aluno de pós-graduação.

Agradeço também aos membros desta banca avaliadora, por contribuírem com o trabalho em questão, juntamente com meus desenvolvimentos acadêmicos e consequentemente profissionais e pessoais.

Agradeço também a Prof.^a Dra. Juliana Delatim Simonato, por auxiliar no desenvolvimento e implementação deste projeto, estando sempre à disposição para contribuir e auxiliar na melhora deste trabalho.

Agradeço a todos integrantes do Laboratório de Ecotoxicologia Animal da UEL (LEFA), que auxiliaram nos trabalhos dentro do laboratório, sempre me passando seus conhecimentos, com muita paciência e atenção, destacando Vanessa Bezera e Tiago Tomiama Alvim. Gostaria de dedicar um agradecimento especial para Gabriella Maria Curilazo Dias pelo desenvolvimento do projeto em conjunto, pela confiança e auxílio. E para minha querida amiga Mariana Lauer, por sempre estar ao meu lado, tanto no desenvolvimento da parte laboratorial deste projeto, quanto no crescimento pessoal.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Dr. Adalto Bianchini e Dra. Patricia G. Costa da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pela parceria e realização das análises de cobre nas amostras de água e biota.

Agradeço os membros da minha família, especialmente meu pai James Pernambuco Filho, por sempre ter me apoiado nas minhas escolhas, sejam elas pessoais ou profissionais, por sempre confiar em mim, por além de pai um grande amigo do qual sei que posso contar a qualquer momento e em qualquer situação!

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

O sentido da vida é estar vivo. É tão claro, tão óbvio e tão simples. Mesmo assim, todo mundo não para de correr em pânico, como se fosse necessário conseguir alguma coisa além de si próprio.

Alan Watts

PERNAMBUCO, Nicholas Alexandre Alves. **Avaliação do potencial da macrófita *Pistia stratiotes* em atenuar os efeitos genotóxicos e fisiológicos do cobre para o teleósteo *Prochilodus lineatus***. 2022. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O cobre (Cu), metal essencial presente no cotidiano das populações humanas, pode se acumular em corpos de água e promover efeitos nocivos em concentrações acima do nível biológico ideal. Como alternativa para a retirada deste elemento do ambiente, podem ser utilizadas técnicas de fitorremediação, empregando plantas para retirar e imobilizar contaminantes. Entretanto, trabalhos abordando os efeitos da fitorremediação em conjunto com animais ainda são escassos. Assim, este estudo visou analisar o potencial da macrófita *Pistia stratiotes*, conhecida como “alface d’água”, na redução dos efeitos do cobre sobre o teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus*. Para isso foram realizados experimentos, com tempos de exposição distintos (24 e 96 h). Para cada tempo foram estabelecidos quatro grupos, com peixes expostos: i) apenas à água (CTR), ii) à água com a planta (CTRPi); iii) à água contendo $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de (Cu); iv) à água contendo $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu na presença da planta (CuPi). Cada grupo foi composto por 10 aquários, contendo um exemplar de *P. lineatus* e, nos grupos CTRPi e CuPi, um exemplar de *P. stratiotes*. Após as exposições, amostras de sangue e as brânquias foram coletadas para análises de parâmetros genotóxicos (danos no DNA), hematológicos (número de eritrócitos e concentração de hemoglobina), metabólicos (glicose plasmática) e ionorregulatórios (íons plasmáticos e atividade branquial da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{H}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ e anidrase carbônica). A exposição de 96 h promoveu 55% de mortalidade dos peixes do grupo Cu, enquanto no grupo CuPi foi observado 30% de mortalidade. Os resultados dos biomarcadores mostraram que os efeitos do cobre no aumento na glicemia e nos danos no DNA foram menores no CuPi. Os peixes do grupo CuPi apresentaram aumento na atividade da $\text{H}^+\text{-ATP}$ em 24 h e 96 h e redução transitória na $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ em 24 h. Houve diminuição de cobre dissolvido na água nos grupos Cu e CuPi após 24 h em relação ao tempo zero, ressaltando-se valores menores de Cu na água do grupo CuPi em relação ao grupo Cu. Após 96 h, verificou-se o aumento na concentração de cobre na raiz das plantas. Um aumento significativo na concentração de cobre também foi verificado nas brânquias dos peixes tanto dos grupos Cu e como CuPi. Estes resultados mostram que, além da mortalidade, os efeitos subletais do cobre na glicemia, danos no DNA, atividade branquial da $\text{H}^+\text{-ATPase}$ e anidrase carbônica foram atenuados na presença da planta, que acumulou cobre nas raízes. Assim, com base nos registros de mortalidade e nos biomarcadores analisados, conclui-se que *P. stratiotes* foi capaz de atenuar alguns dos efeitos do cobre para *P. lineatus*, indicando que esta planta pode atuar na fitorremediação de cobre, acumulando este metal em suas raízes.

Palavras-chave: ATPases; danos no DNA; ecotoxicologia; fitorremediação; Ionorregulação.

PERNAMBUCO, Nicholas Alexandre Alves. **Evaluation of the potential of the macrophyte *Pistia stratiotes* to attenuate the genotoxic and physiological effects of copper on the teleost *Prochilodus lineatus***. 2022. 75 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Copper (Cu), an essential metal present in the daily lives of human populations, can accumulate in water bodies and promote harmful effects at concentrations higher than the biological ones. As an alternative for the removal of this metal from the environment, phytoremediation techniques can be used, which employ the use of plants to remove and immobilize contaminants. However, studies addressing the effects of phytoremediation in conjunction with animals are still scarce. Thus, this study aimed to analyze the potential of the macrophyte *Pistia stratiotes*, known as “water lettuce”, in reducing the effects of Cu on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*. For this, experiments were carried out, with different exposure times (24 and 96 h). For each time, four groups were established, with fish exposed: i) only to water (CTR), ii) to water with the plant (CTR*Pi*); iii) to water containing 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ of copper (Cu); iv) water containing 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ of copper in the presence of the plant (Cu*Pi*). Each group consisted of 10 aquaria, containing one specimen of *P. lineatus* and one specimen of *P. stratiotes* in the CTR*Pi* and Cu*Pi* groups. After exposure, samples of blood and the gills were removed for the analysis of genotoxic (DNA damage), hematological (number of erythrocytes and hemoglobin concentration), metabolic (plasma glucose) and ionoregulatory (plasma ions and gill activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{H}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ and carbonic anhydrase) parameters. The 96h-exposure caused 55% mortality of fish from Cu group, while in the Cu*Pi* group, 30% mortality was observed. The results of the biomarkers showed that the effects of copper on increasing the blood glucose and DNA damage were reduced in Cu*Pi* group. Fish from the Cu*Pi* group showed an increase in $\text{H}^+\text{-ATP}$ activity at 24 h and 96 h and a transient reduction in $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ at 24 h. There was a decrease of dissolved copper in the water of the Cu and Cu*Pi* groups, after 24 h in relation to time zero, with lower values of Cu in the water of the Cu*Pi* group in relation to the Cu group. After 96 h, there was an increase in copper concentration in the roots of the plants. A significant increase in copper concentration was also observed in the gills of fish from both Cu and Cu*Pi* groups. These results show that, in addition to mortality, the sublethal effects of copper on blood glucose, DNA damage, gill activity of $\text{H}^+\text{-ATPase}$ and carbonic anhydrase were attenuated in the presence of the plant, which accumulated copper in the roots. Thus, based on the mortality data and on the analyzed biomarkers, it is concluded that *P. stratiotes* was able to attenuate some of the effects of copper for *P. lineatus*, indicating that this plant can act in the phytoremediation of copper, accumulating this metal in its roots.

Key words: ATPases; DNA damage; ecotoxicology; ionoregulation; phytoremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das principais fontes de contaminação de efluentes.....	13
Figura 2 - Aplicabilidade do cobre dentro do setor automotivo, tecnológico e econômico.....	15
Figura 3 - Representação da classificação de corpos de água segundo o CONAMA	16
Figura 4 - Exemplar juvenil do teleósteo dulcícola <i>Prochilodus lineatus</i>	17
Figura 5 - Mapa de registros da distribuição de <i>Prochilodus lineatus</i>	17
Figura 6 - Funcionamento do balanço iônico nas brânquias de teleósteo de água doce	20
Figura 7 - Principais formas pelas quais ocorre o processo de fitorremediação	21
Figura 8 - Exemplares de <i>P. stratiotes</i>	22
Figura 9 - Processo de absorção de Cu através das raízes de <i>P. stratiotes</i> ..	23
Figura 10 - Delineamento experimental.....	37
Figura 11 - Escore de danos no DNA de eritrócitos de <i>P. lineatus</i>	44
Figura 12 - Número de eritrócitos e concentração de hemoglobina no sangue	45
Figura 13 - Concentração plasmática de Na ⁺ em <i>P. lineatus</i>	46
Figura 14 - Concentração plasmática de K ⁺ em <i>P. lineatus</i> 96 h.....	46
Figura 15 - Concentração plasmática de glicose em <i>P. lineatus</i>	47
Figura 16 - Atividade branquial da Na ⁺ -K ⁺ -ATPase em <i>P. lineatus</i>	48
Figura 17 - Atividade branquial da H ⁺ -ATPase em <i>P. lineatus</i>	49
Figura 18 - Atividade branquial da Ca ²⁺ -ATPase em <i>P. lineatus</i>	50
Figura 19 - Atividade branquial da Anidrase Carbônica em <i>P. lineatus</i>	51
Figura 20 - Acúmulo de cobre nos tecidos de <i>P. stratiotes</i>	53
Figura 21 - Acúmulo de cobre nas brânquias <i>P. lineatus</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água monitorados durante cada tempo experimental	37
Tabela 2	– Características biométricas dos exemplares de <i>Prochilodus lineatus</i> usados nos experimentos	38
Tabela 3	– Características biométricas dos exemplares de <i>Pistia stratiotes</i> utilizados nos experimentos	39
Tabela 4	– Concentrações de Cu dissolvido na água dos aquários do experimento de 24 h.....	52
Tabela 5	– Concentrações de Cu dissolvido na água dos aquários do experimento de 96 h.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Anidrase Carbônica
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino
CaATP	Calcio ATPase
CaCl ₂	Cloreto de Calcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Cd	Cádmio
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina
CL ₅₀	Concentração Letal Média para 50% dos Organismos
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr	Cromo
CTR	Controle
CTRPi	Controle com Planta
Cu	Cobre
CuPi	Cobre com Planta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
Fe	Ferro
H ₂ CO ₃	Ácido Carbônico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HATP	Próton ATPase
Hb	Hemoglobina
HNO ₃	Ácido Nitrico
K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

Mn	Manganês
MS	Mato Grosso do Sul
Na ⁺	Sódio
NaKATP	Sódio/Potássio ATPase
NaCl	Cloreto de Sódio
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
RS	Rio Grande do Sul
RBC	Número de Células Vermelhas por mm ³
SNK	Teste de Student-Newman-Keuls
UEL	Universidade Estadual de Londrina
Zn	Zinco

Apresentação

Esta dissertação está organizada de forma a atender às normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Após uma Introdução Geral, segue um manuscrito gerado a partir do projeto de pesquisa desenvolvido.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	HIPÓTESE	24
3	OBJETIVO	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5	MANUSCRITO	32
5.1	INTRODUÇÃO	34
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.2.1	Meio de Exposição e Delineamento Experimental	36
5.2.2	Amostragem	38
5.2.3	Análise Genotóxica.....	39
5.2.4	Análise Metabólica.....	39
5.2.5	Análises Hematológicas	39
5.2.6	Análise da Atividade Branquial das Atpases e Anidrase Carbônica	40
5.2.7	Concentração de Cu na Água, Planta e Brânquias	42
5.2.8	Análise Estatística	42
5.3	RESULTADOS.....	42
5.3.1	Mortalidade.....	43
5.3.2	Análises Genotóxicas	43
5.3.3	Número de Eritrócitos e Concentração de Hemoglobina.....	44
5.3.4	Glicemia.....	47
5.3.5	Atividade Branquial das ATPases e Anidrase Carbônica	47
5.3.6	Cu na Água e Acúmulo na Planta e nas Brânquias.....	51
5.4	DISCUSSÃO	54
5.5	CONCLUSÃO	60
5.6	AGRADECIMENTOS	60
5.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO GERAL

A distribuição de água doce em nosso planeta é considerada desigual. Dentre os cinco continentes, a América representa 46% destas águas, sendo 12% localizadas no Brasil (Brasil, 2019). Entretanto, grande parte dos rios e lagos brasileiros estão sendo impactados devido ao aumento do volume de efluentes (domésticos e industriais) provenientes do processo de crescimento populacional, aumento de processos de industrialização e da produção agrícola. Estas águas passam por processo parcial de tratamento ou até mesmo não passam por este processo, caracterizando assim um problema ambiental (Aravindhan et al., 2007).

A toxicidade destes efluentes deve-se ao efeito combinado de frações de matéria orgânica, juntamente com detergentes, metais, compostos químicos de origem doméstica, que acabam por ser eliminados através das águas destes setores urbanos (Figura 1), juntamente com outros químicos não mensurados durante o processo de tratamento (Tripathi et al., 2000; Picado et al., 2008).

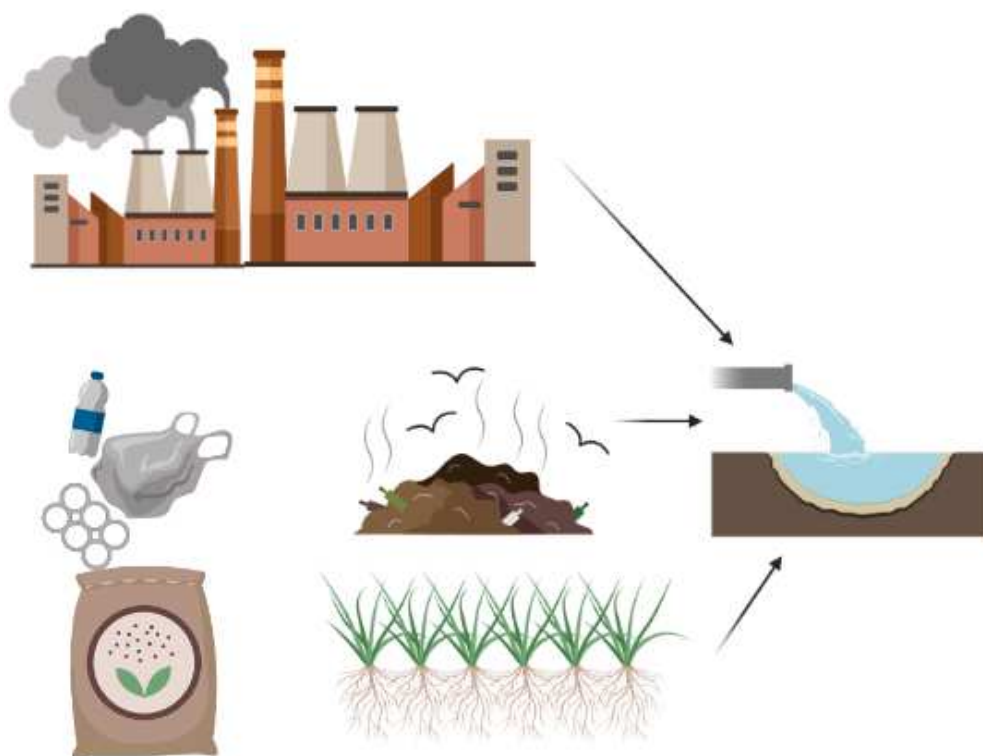


Figura 1 - Representação das principais fontes de contaminação de efluentes sobre corpos de água. Elaborada pelo autor.

A integridade ecológica de rios e riachos podem ser amplamente ameaçadas e degradadas por quantidades exacerbadas de contaminação das fontes antrópicas, podendo causar efeitos adversos na biota e até para humanos (Saad-Allan e Elhahack 2015). Dentre os compostos despejados nessas águas, destacam-se os metais, apesar de serem encontrados naturalmente no ambiente, podem apresentar aumento em suas concentrações devido a sua extração e uso. Esses metais podendo ser adsorvidos e livres (na forma iônica). Quando se encontram na forma iônica, são capazes de adentrar os seres vivos presentes no local, tendo os peixes como animais mais susceptíveis, incorporando-os através das brânquias, sendo o principal órgão de obtenção e regulação osmoiônicas nesses animais, tendo seu epitélio alterado quando em contato com quantidades elevadas de cobre, por exemplo (Sfakianakis et al., 2015; Malik et al., 2010)

Alguns metais são componentes essenciais para algumas funções biológicas, sendo cofatores em vários processos biológicos e tendo sua homeostase cuidadosamente regulada por um sistema de transportadores de proteína envolvendo a obtenção, distribuição, armazenamento e excreção de íons metálicos no corpo (Malhotra et al., 2020). Inicialmente não são considerados prejudiciais em quantidades adequadas no organismo, porém podem tornar-se tóxicos em níveis acima da sua concentração fisiológica requerida para o organismo (Kim et al., 2019; Baldissera et al., 2020), causando efeitos tóxicos, acumulando a um nível substancialmente alto em tecidos. Dentre esses metais podemos citar cobre (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe).

Por exemplo, Cu é necessário para o funcionamento adequado de funções biológicas, podendo ser encontrado em enzimas e outros compostos necessários ao funcionamento do organismo (Wood 2012). Atualmente, o Cu é um dos metais mais encontrados em corpos de água (Fry et al., 2020), sendo encontrado em rios brasileiros em diversas concentrações: 3,5 μgL^{-1} no rio Camaquã, próximo à uma antiga área de mineração de Cu após 20 anos de inatividade (Abril et al., 2018); 12,1 μgL^{-1} na bacia do Rio Sinos (RS) (Weber et al., 2013); 15 μgL^{-1} na Bacia do Rio Bacanga (MA) (Pinheiro-Sousa et al., 2019); 16 μgL^{-1} na Bacia do Alto Rio Paraná (MS) (Viana et al., 2018) e no Rio Doce após o rompimento da barragem de mineração no município de Mariana (MG), apresentando uma concentração de 62 μgL^{-1} de Cu em um ponto não afetado

pela lama e $1.427 \mu\text{gL}^{-1}$ na jusante de um dique afetado pela lama (Carvalho et al., 2018).

O Cu é amplamente utilizado no setor automobilístico, construção civil, composição de transformadores, geradores, cabos condutores, moedas, fios, etc (Figura 2). Sua implementação em diversos setores é decorrente das suas propriedades: boa condutividade elétrica e térmica, resistência a processos corrosivos e possuindo flexibilidade (Fry et al., 2020; Malhotra et al., 2020). Porém, o despejo de efluentes e descartes inadequados, promovem a liberação deste metal para o ambiente.

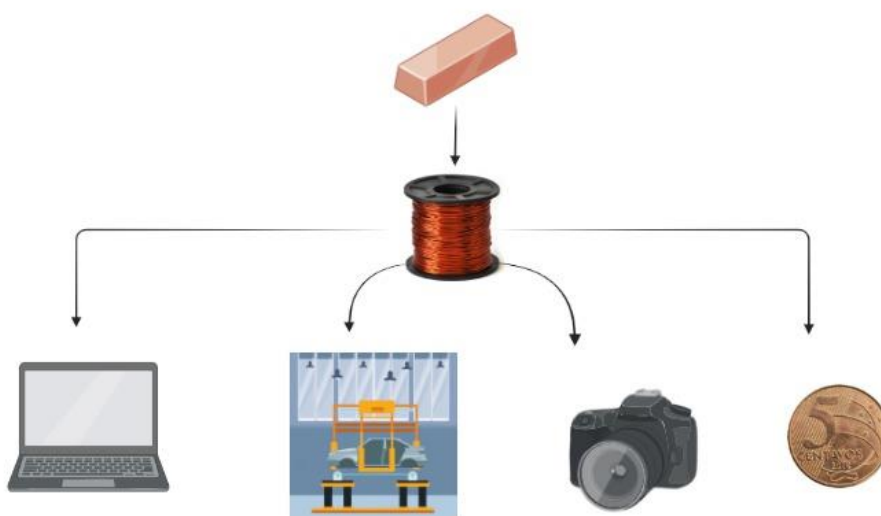


Figura 2 – Aplicabilidade do cobre dentro do setor automotivo, tecnológico e econômico. Elaborada pelo autor.

E para que haja uma fiscalização dos efluentes descartados nos corpos de água e estabelecer limites protetivos no território nacional, faz-se presente o CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, que por meio da portaria nº 357/2005, regulamenta a classificação dos corpos de água e padrões de lançamentos de efluentes. Essa classificação é dividida em quatro categorias para ambientes de água doce, de acordo com as principais características: Classe 1 abrangendo águas que podem ser destinadas ao consumo humano após tratamento simplificado e à proteção das comunidades aquáticas; Classe 2 são águas que podem ser destinadas ao consumo humano após tratamento convencional, à proteção das comunidades aquáticas e à aquicultura e atividade de pesca; Classe 3 são águas que podem ser destinadas ao consumo humano

após tratamento convencional ou avançado, à pesca amadora e dessedentação de animais; e por fim Classe 4 são águas que podem ser destinadas à navegação ou harmonia paisagística (Figura 3). Dentro dessas diretrizes, a concentração máxima dissolvida permitida de Cu para águas doces de classe 1 e 2 é de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu dissolvido e para águas de classe 3 é de $13 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu dissolvido (Brasil, 2005).

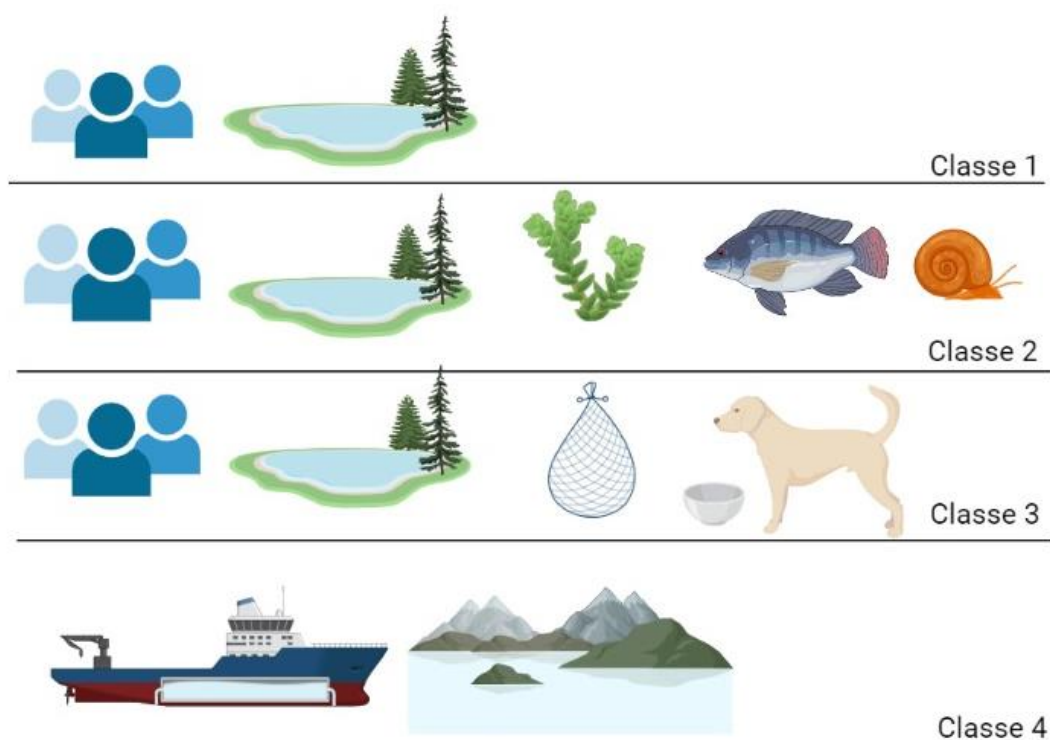


Figura 3 – Representação da classificação de corpos de água segundo o CONAMA, portaria n° 357/2005. Elaborada pelo autor.

Devido a este cenário, a utilização de peixes pode auxiliar no processo de avaliação e estudos envolvendo contaminantes presentes em corpos de água e seus possíveis impactos (Vieira et al., 2016), especialmente se tratando de contaminação por metais. Esses animais são utilizados para indicar a qualidade do ambiente, sendo capazes de acumular compostos tóxicos em seus tecidos (Simonato et al., 2016). Podendo assim auxiliar em estudos a respeito de contaminantes presentes em corpos de água e possíveis impactos decorrentes dessas contaminações (Authman et al., 2015).

Um excelente exemplo de modelo biológico utilizado na sinalização da qualidade ambiental é o *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), popularmente conhecido como curimatá ou curimba (Figura 4). Habitando rios,

lagos e reservatórios, estando distribuído em parte da região neotropical, e dentro do território nacional, especialmente na bacia do Alto Rio Paraná (Figura 5). É um peixe iliófago, alimentando-se de restos orgânicos, sedimentos (orgânicos e inorgânicos), detritos e algas pequenas (Agostinho et al., 2003).



Figura 4 – Exemplar juvenil do teleóstéo dulcícola *Prochilodus lineatus*. Museu de Zoologia da UEL (MZUEL).

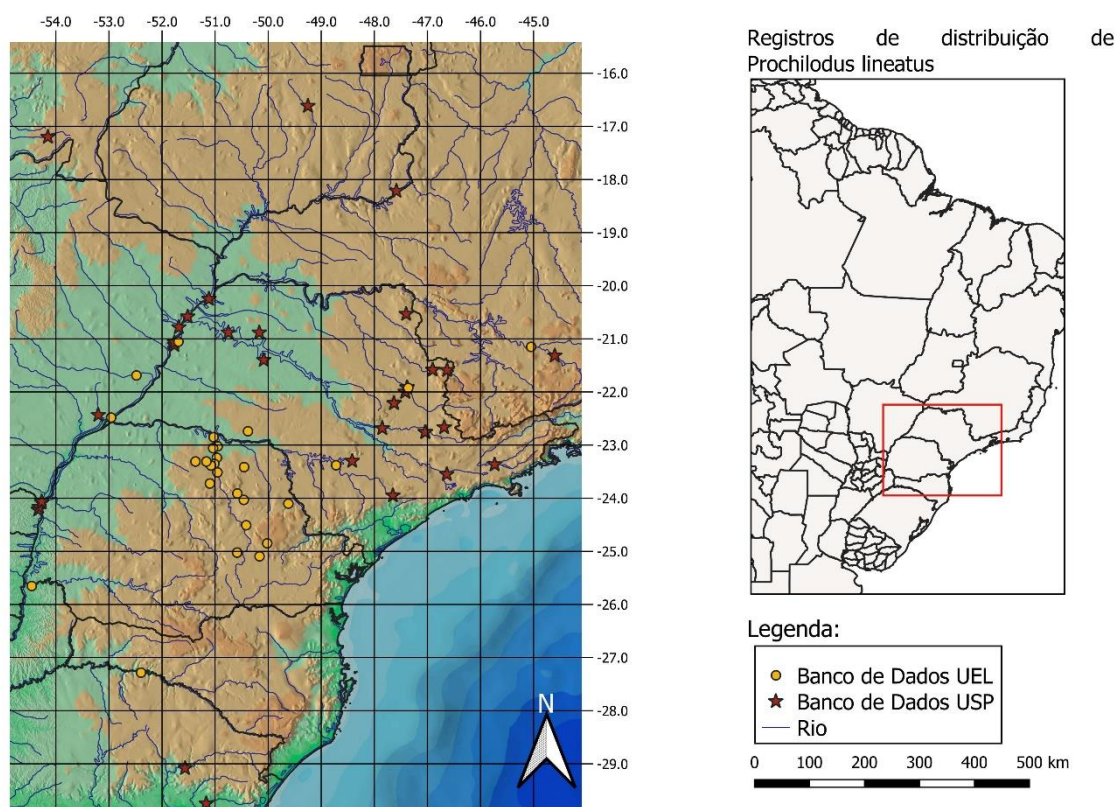


Figura 5 – Mapa de registros da distribuição de *Prochilodus lineatus* em parte da região Neotropical. Dados obtidos a partir da base de dados spicieslink, para região dos estados de São Paulo (SP) e Paraná (PR), segundo dados fornecidos pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) e Universidade de São Paulo (USP). Elaborado pelo autor.

Prochilodus lineatus já foi utilizado em diversos estudos para avaliar suas respostas diante diferentes tipos de contaminantes ambientais, como Cu (Dos Santos Carvalho et al., 2015; Roda et al., 2020; Simonato et al., 2016; Tesser et al., 2019), cafeína (Santos-Silva et al., 2018) benzo(A)pireno (Santos et al., 2018), lambda cialotrina e imidacloprido (Alvim e Martinez, 2019) e microplástico (Roda et al., 2020). Estudos mostram que *P. lineatus* apresentou sensibilidade quando exposto a metais, incluindo Cu (Mazon e Fernandes 1999; Nascimento et al., 2012), podendo promover proliferação de células mitocondriais e pavimentosas na brânquia (Mazon et al., 2002), aumento do hematócrito, contagem de células vermelhas e concentração de hemoglobina (Cerqueira e Fernandes 2002) e aumento na concentração de Cu nas brânquias (Wood 2012), que acaba sendo transportada pela via sanguínea para outros órgãos. Além disso, *P. lineatus* exposto a concentrações relevantes de Cu ($13 \mu\text{gL}^{-1}$ e $5 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente) sofreram estresse oxidativo e danos no DNA de células sanguíneas (Simonato et al., 2016).

Para assim analisar possíveis efeitos gerados pela contaminação em peixes são empregados biomarcadores, ferramentas de análise ambiental que podem ser utilizadas de forma preditiva, antecipando danos em níveis de organização biológica superiores (Cajaraville et al., 2000), podendo ser medidas de forma experimental. São usados como modo preventivo, possibilitando desenvolvimento de estratégias antes que danos irreversíveis sejam causados ao ecossistema. São considerados como indicadores de curto prazo de efeitos biológicos de longo prazo (Cajaraville et al., 2000).

Os biomarcadores são extremamente úteis para indicar a contaminação ambiental e mudanças biológicas nos organismos, que podem ser decorrentes da ação de alguns agentes (Guiloski et al., 2017). Podendo ser antioxidantes, parâmetros hematológicos, fisiológicos, histológicos, imunológicos, genéticos e estruturais. A ocorrência de alterações nos biomarcadores, como a presença de danos ao material, sendo essa uma resposta causada pela presença do contaminante afetando o DNA celular, levando a desestabilização da estruturado DNA e desenrolar do hélice de DNA assim ocasionando o dano e alterações na concentração de hemoglobina (Hb).

Podendo ocorrer também alterações na atividade da anidrase carbônica (AC), uma proteína que ajuda a regular o equilíbrio ácido-básico e o pH no

sangue e em outros tecidos, tendo papel importante na quebra de CO_2 plasmático, sendo responsável por catalisar a conversão de dióxido de carbono e água, resultando em ácido carbônico (H_2CO_3) e gera substrato para troca de cloreto-bicarbonato que ocorre através na membrana apical, excretando bicarbonato em troca da entrada de cloreto (Perry et al., 1984), assim acelerando um processo naturalmente demorado. Assim auxiliando na difusão de dióxido de carbono e próton dentro da célula. sendo aplicada para avaliar a taxa de transporte de CO_2 e o reflexo que essa molécula apresenta no pH do meio.

Mudanças na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NaKATP), $\text{H}^+\text{-ATPase}$ (HATP) e $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ (CaATP). Essas enzimas que hidrolisam o grupo fosfato liberando ATP para realização do transporte de íons e prótons contra os respectivos gradientes de concentração, estando amplamente distribuídas nas células branquiais dos peixes. Essas enzimas utilizam a energia liberada da hidrólise do ATP para manter os processos de transporte de íons pelas membranas e conseqüentemente também realizar a regulação do pH nos padrões de acordo com o tipo celular.

A NaKATP é responsável pela troca de íons sódio (provenientes do meio intracelular), por íons potássio (presentes no meio extracelular, na proporção 3:2, respectivamente, gerando assim um potencial elétrico positivo através da membrana, favorecendo a obtenção de sódio para o interior da célula. Já a HATP, também localizada nas células das brânquias, é responsável por criar um gradiente eletroquímico através da extrusão de prótons H^+ (provenientes de outras reações que ocorrem dentro da célula) para fora da célula, favorecendo ainda mais a obtenção de Na^+ para célula branquial.

CaATP é uma proteína de transporte também localizada na membrana plasmática servindo para remover Ca^{2+} da célula (servindo para regular sua concentração dentro da célula), novamente favorecendo a formação de um gradiente eletroquímico, conseqüentemente levando a entrada de íons para célula.

O funcionamento da NaKATP, HATP, CaATP e AC são componentes importantes para o funcionamento adequado do metabolismo do animal, atuando na osmorregulação, ionorregulação, trocas gasosas e mantendo a taxa metabólica do organismo em um estado de homeostase (Figura 6).

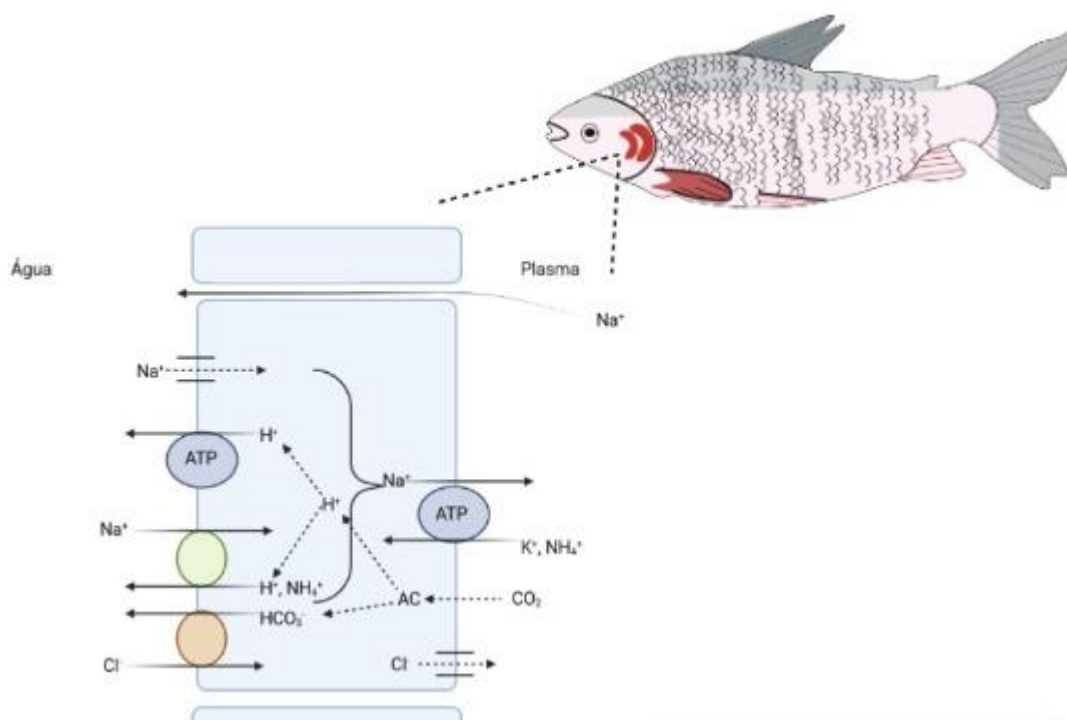


Figura 6 – Ilustração do funcionamento do balanço iônico nas brânquias de teleosteo de água doce. Adaptado de: Grosell, Nielsen, Bianchini (2002).

Para a retirada de Cu dos efluentes, alguns métodos são empregados: quelação, complexação, precipitação química, filtração através de membranas, troca de íons, tratamentos eletroquímicos e bioadsorção (Bilal et al., 2013). Outra metodologia empregada para a remediação do Cu presente na água é a aplicação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Leonel et al., 2020), restauração de locais degradados pelo processo de urbanização (Hu, 2020) e através da imobilização covalente do ácido fólico com nano sílica clorada (Mahmoud et al., 2019). Porém estes processos possuem elevado custo para aplicabilidade, o que por sua vez acaba por inviabilizá-los. Uma alternativa encontrada é a utilização de plantas aquáticas capazes de exercer um processo de fitorremediação, sendo catalizadoras naturais na remoção ou imobilização de metais, capazes de absorver e acumular esses metais em sua biomassa em altos níveis (Yu et al., 2015).

A fitorremediação é uma técnica que utiliza espécies de plantas para remover, degradar e tornar inofensivo materiais perigosos que estão presentes no solo, água e substrato (Garbisu e Alkarta 2001; Odjegba e Fasidi., 2004; Wang et al., 2020). Considerado um método de baixo custo, confiável e amigável

ao ambiente (Ehsan et al., 2014; Tao et al., 2016). A fitorremediação utilizando plantas aquáticas pode ser feita por alguns mecanismos (Figura 7). Como a fitoestabilização, immobilizando os contaminantes por adsorção ou acúmulo nas raízes ou por precipitação na zona interior da raiz. A rizofiltração, quando as raízes adsorvem ou absorvem os contaminantes por precipitação ou por sequestro. A fitodegradação, envolvendo a degradação dos contaminantes por processos metabólicos da planta, utilizando ação enzimática e a oxidação proveniente da fotossíntese, que hidrolisa os compostos em pequenas unidades. A fitoextração é o processo de translocação ou absorção dos contaminantes pelo broto da planta. Já na fitoacumulação é feito um estoque de contaminantes pelos tecidos da planta, utilizando o transporte realizado pelo xilema, assim acumulando os poluentes no vacúolo, que por sua vez são convertidos em formas não tóxicas. E por fim, a fitovolatilização, a remoção dos contaminantes precisam ser transformados em compostos solúveis em água e não tóxicos (Jeevanantham et al., 2019).

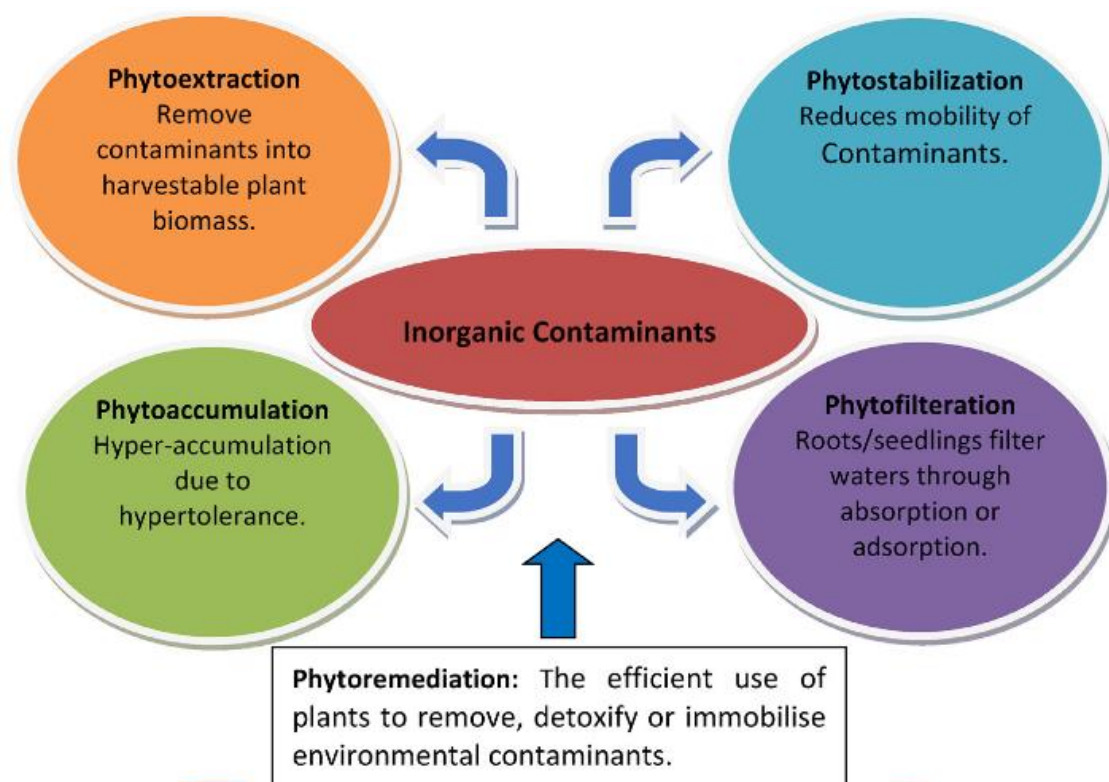


Figura 7. Esquema das principais formas pelas quais ocorre o processo de fitorremediação.
Fonte: Ansari et al., 2020

A literatura traz alguns modelos de macrófitas utilizadas em estudos deste processo, como é o caso de *Lemna minor* e *Salvinia auriculata* (Panfili et al., 2017), *Vitiveria zizaniodes* L. (Antiochia et al., 2007), *Myriophyllum aquaticum* (Guo et al., 2020) e *Pistia stratiotes* (Galal e Farahat 2015; Putra et al., 2015; Lakra et al., 2019). Normalmente plantas que são utilizadas no processo de fitorremediação devem possuir uma biomassa alta, rápido crescimento, hiperacumulação, capacidade de aumentar a atividade mitocondrial, absorver nutrientes e remover sólidos suspensos (Odjegba e Fasidi., 2004).

O modelo deste estudo é a macrófita *P. stratiotes* (Figura 8), amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, pertencente à família Aracea, monocotiledônea, é uma planta aquática flutuadora com raízes adventícias extensas, com alta taxa vegetativa de propagação, uma erva perene, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais (Odjegba e Fasidi., 2004), cobrindo grande áreas da superfície aquática (Sasmal e Monda 2013), formando “tapetes” (Adebayo et al., 2011). Essa espécie também é capaz de acumular macronutrientes em suas folhas em altas concentrações quando comparada com a concentração da raiz, removendo de forma eficiente Cu (Figura 9) (Putra et al., 2015; Lakra et al., 2019), Pb (Putra et al., 2015; Lakra et al., 2019), Ni (Galal e Farahat, 2015) e Cr (Lakra et al., 2019).



Figura 8 – Exemplar de *P. stratiotes*. Fonte: Google Imagens

Essa macrófita apresenta tolerância ao estresse proveniente da contaminação, através de ajustes metabólicos, dentre eles, ativando a detoxificação e um sistema de defesa antioxidante e ações metabólicas de

proteção, para que a planta possa manter ou reestabelecer metabolismo (Li et al., 2022).

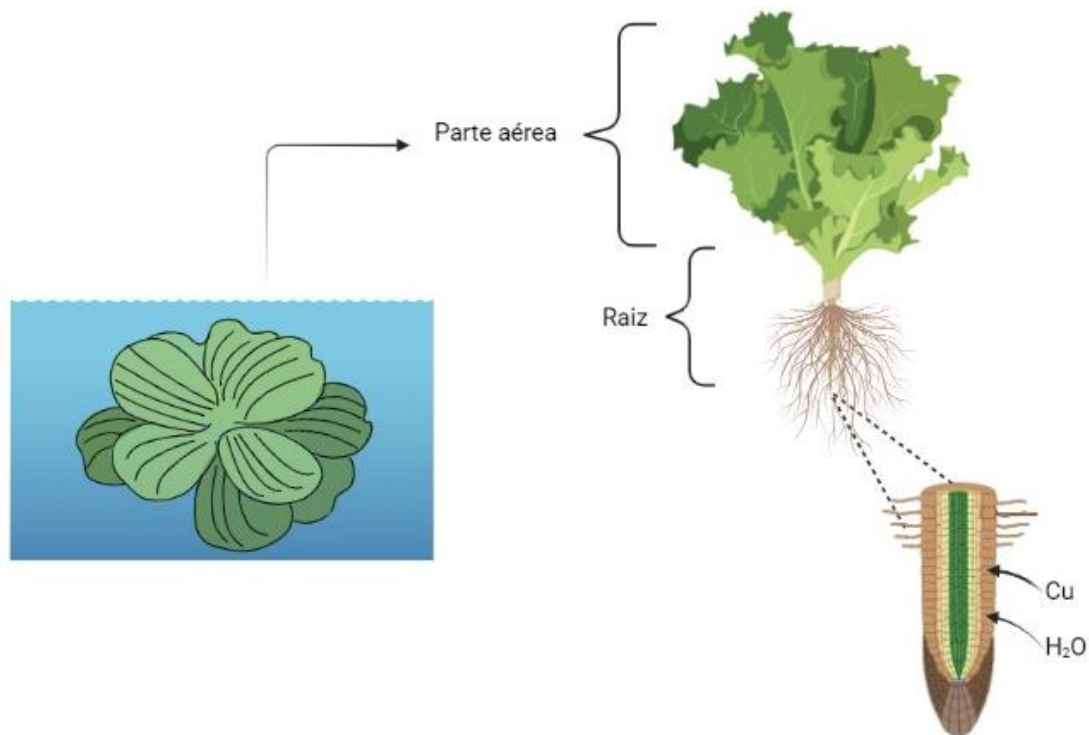


Figura 9 – Representação do processo de absorção de Cu através das raízes de *P. stratiotes*. Elaborado pelo autor.

Mesmo que muitos estudos abordem o processo de fitorremediação do ambiente aquático, há uma escassez de estudos que abordem em conjunto o processo de fitorremediação na presença de peixes expostos a metais. Em um desses poucos estudos, *P. stratiotes* e *E. crassipes* mostraram-se eficaz em reduzir a concentração de Cd, Zn, Cr e Cu na água, consequentemente mantendo exemplares de uma espécie de tilápia vivos por prolongados períodos expostos à sua CL50 (Victor et al., 2016). A combinação de *L. minor* e *Azolla pinnata* também foram eficientes para recuperação de macromoléculas e na diminuição do acúmulo em tecidos de *Labeo rohita*, após exposição a Mn, Fe, Zn e Cu (Vaseem e Banerjee, 2015).

Assim, fica clara a importância de estudos utilizando uma espécie de peixes nativa, em conjunto com a macrófita aquática (*P. lineatus* e *P. stratiotes*, respectivamente), para avaliar os possíveis efeitos protetores da fitorremediação na qualidade de vida de peixes que se encontram em ambientes contaminados com Cu.

2. HIPÓTESE

A macrófita *Pistia stratiotes* será capaz de atenuar os efeitos fisiológicos e genotóxicos promovidos pelo Cu nos exemplares de *P. lineatus*.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o potencial de *P. stratiotes* em atenuar os efeitos agudos do cobre em parâmetros hematológicos e metabólicos de juvenis do teleósteo dulcícola *P. lineatus*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos da exposição ao cobre em *P. lineatus*, na ausência e na presença de *P. stratiotes*, em parâmetros hematológicos e metabólicos.
- Avaliar os possíveis efeitos do cobre sobre a atividade branquial de enzimas de transporte iônico e nas concentrações plasmáticas de íons.
- Verificar se a planta é capaz de diminuir a possível ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos, nos peixes expostos ao cobre.
- Comparar os resultados obtidos na presença e na ausência de *P. stratiotes* para verificar se a co-exposição é benéfica para o peixe e se a fitorremediação, atenua os efeitos do cobre.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, A. A.; BRISKI, E., BRISKI, E.; KALACI, O.; HERNANDEZ, M.; GHABOOLI, S.; BERIC, B.; CHAN, F. T.; ZHAN, A.; FIFIELD, E.; LEADLEY, T.; and MACISAAC, H. J. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*) in the Great Lakes: Playing with fire? ***Aquatic Invasions***, v. 6, n. 1, p. 91-96, 2011.

ALVIM, T. T.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 842, p. 85-93, 2019.

AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.C.; MOUNEYRAC, C. (Ed.). ***Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks***. Academic press, 2015.

ANTIOCHIA, R.; CAMPANELLA, L.; MOVASSAGHI, Q. The use of vetiver for remediation of heavy metal soil contamination. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, v. 388, n. 4, p. 947-956, 2007.

ARAVINDHAN, R.; RAO, J. R.; NAIR, B. U. Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*. ***Journal of Hazardous Materials***, v. 142, n. 1-2, p. 68-76, 2007.

ANSARI, A. A.; Naeem, M.; Gill, S. S.; AlZuaibr, F. M. Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. ***The Egyptian Journal of Aquatic Research***, v. 46, n. 4, p. 371-376, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>

AGOSTINHO, A. A., HARUMI, C. G., SUZUKI, I., JÚLIO Jr., H. F. Migratory fish of the Upper Paraná River Basin. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. Migratory fishes of South America. ***World Fisheries Trust: Victoria, BC***, Canada, 2003.

AUTHMAN, M. MN.; ZAKI, M. S.; KHALLAF, E. A.; ABBAS, H. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. ***Journal of Aquaculture Research & Development***, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2015.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BARROSO, D. C.; PEREIRA, R. S.; ALESSIO, K. O.; BALDISSEROTTO, B.; VAL, A. L. Acute exposure to phosphoryl transfer network of *Cichlasoma amazonarum*: Impacts on bioenergetics homeostasis. ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology***, v. 238, p. 108846, 2020.

BILAL M.; SHAH J. A.; ASHFAQ T.; GARDAZI S. M. H.; TAHIR A. A.; PERVEZ A.; HAROON H.; MAHMOOD Q. Waste biomass adsorbents for copper removal from industrial wastewater – A review. ***Journal of Hazardous Materials***, v. 263, p. 322-333, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar. 2005. n. 053, p. 58-63. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: fev. 2021.

BRASIL. Agência Nacional das Águas. Conjuntura Recursos Hídricos Brasil, 2019. Disponível em: <<http://conjuntura.ana.gov.br/quantiquali>> Acesso em: jan. 2021

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, 247, 295-311, 2000.

CARVALHO CAVALCANTE, D. N.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. The response of neotropical fish species (Brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 3, p. 476-485, 2018

CERQUEIRA, C. C.C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 2, p. 83-91, 2002.

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

EHSAN, S.; ALI, S.; NOUREEN, S.; MAHMOOD, K.; FARID, M.; ISHAQUE, W.; SHAKOOR, M. B.; RIZWAN, M. Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 164-172, 2014.

FRY, K. L.; WHEELER, C. A.; GILLINGS, M. M.; FLEGAL, A. R.; TAYLOR, M. P. Anthropogenic contamination of residential environments from smelter As, Cu and Pb emissions: Implications for human health. **Environmental Pollution**, v. 262, p. 114235, 2020.

GALAL, T. M.; FARAHAT, E. A. The invasive macrophyte *Pistia stratiotes* L. as a bioindicator for water pollution in Lake Mariut, Egypt. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 11, p. 1-10, 2015.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 229-236, 2001.

GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PIANCINI, L. D. S.; DAGOSTIM, A. C.; CIRIO, S. M.; FÁVARO, L. F.; BOSCHEN, S. L.; CESTARI, M. M.; DA CUNHA, C. DE ASSIS, H. C. S. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, 53, 111-120. 2017.

GUO, X.; LIU, M.; ZHONG, H.; LI, P.; ZHANG, C.; WEI, D.; ZHAO, T. Potential of *Myriophyllum aquaticum* for phytoremediation of water contaminated with tetracycline antibiotics and copper. ***Journal of Environmental Management***, v. 270, p. 110867. 2020.

HU, R. Pollution control and remediation of rural water resource based on urbanization perspective. ***Environmental Technology & Innovation***, v. 20, p. 101136. 2020.

JEEVANANTHAM, S.; SARAVANAN, A.; HEMAVATHY, R. V.; KUMAR, P. S.; YAASHIKAA, P. R.; YAVARAJ, D. Removal of toxic pollutants from water environment by phytoremediation: a survey on application and future prospects. ***Environmental Technology & Innovation***, v. 13, p. 264-276, 2019.

KIM, W. K.; PARK, J. W.; LIM, E. S.; LEE, S. K.; KIM, J.; KIM, S.; LEE, S. W.; CHOI, K.; JUNG, J. Tissue-specific antioxidant responses in pale chub (*Zacco platypus*) exposed to copper and benzo [a] pyrene. ***Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology***, v. 92, n. 5, p. 540-545, 2014.

LI, J.; LOCK, R. A. C.; KLAREN, P. H. M.; SWARTS, H. G. P.; STEKHOVEN, F. M. A. H. S.; BONGA, S. E. W.; FLIK, G. Kinetics of Cu²⁺ inhibition of Na⁺ K⁺-ATPase. ***Toxicology Letters***, v. 87, n. 1, p. 31-38, 1996.

LAKRA, K. C.; LAL, B.; BANERJEE, T. K. Application of phytoremediation technology in decontamination of a fish culture pond fed with coal mine effluent using three aquatic macrophytes. ***International Journal of Phytoremediation***, v. 21, n. 9, p. 840-848, 2019.

LEONEL, A. G.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. Advanced Functional Nanostructures based on Magnetic Iron Oxide Nanomaterials for Water Remediation: A Review. ***Water Research***, p. 116693, 2020.

MAHMOUD, M. E.; OSMAN, M. M.; YAKOUT, A. A.; ABDELFATTAH, A. M. Green nanosilica@ folic Acid (VB9) nanocomposite for engineered adsorptive water remediation of bivalent lead, cadmium and copper. ***Powder Technology***, v. 344, p. 719-729, 2019.

MALHOTRA, N.; GER, T. R.; UAPIPATANAKUL, B.; HUANG, J. C.; CHEN, K. H. C.; HSIAO, C. D. Review of copper and copper nanoparticle toxicity in fish. ***Nanomaterials***, v. 10, n. 6, p. 1126, 2020.

MALIK, N.; BISWAS, A.K.; QURESHI, T.A. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bophal. ***Environmental Monitoring and Assessment***, v. 160, n. 1-4, p. 267-276, 2010.

MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). ***Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology***, v. 63, n. 6, p. 797-804, 1999.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. ***Environmental Research***, v. 88, n. 1, p. 52-63, 2002.

NASCIMENTO, C. R.B.; SOUZA, M. M.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology***, v. 155, n. 3, p. 456-461, 2012.

ODJEGBA, V. J.; FASIDI, I. O. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. ***Ecotoxicology***, v. 13, n. 7, p. 637-646, 2004.

PANFILI, I.; BARTUCCA, L. M.; BALLERINI, E.; BUENO, D. D. Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. ***Science of the Total Environment***, v. 601, p. 1263-1270, 2017.

PERRY, S. F.; PAYAN, P.; GIRARD, J. P. Effects of Perfusate HCO₃⁻ and P co₂ on Chloride Uptake in Perfused Gills of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). ***Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences***, v. 41, n. 12, p. 1768-1773, 1984.

PICADO, A.; MENDONÇA, E.; SILVA, L.; PAIXÃO, S. M.; BRITO, F.; CHUNA, M. A.; LEITÃO, S.; MOURA, S.; HERNAN Ro. Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal). ***Environmental Toxicology: An International Journal***, v. 23, n. 4, p. 466-472, 2008.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; JUNIOR, A. R. T.; SILVA, D.; SANTOS, R. L.; NETA, R. N. F. C. A screening test based on hematological and histological biomarkers to evaluate the environmental impacts in tambaqui (*Colossoma macropomum*) from a protected area in Maranhão, Brazilian Amazon. ***Chemosphere***, v. 214, p. 445-451, 2019.

PUTRA, R. S.; CAHYANA, F.; NOVARITA, D. Removal of lead and copper from contaminated water using EAPR system and uptake by water lettuce (*Pistia Stratiotes L.*). ***Procedia chemistry***, v. 14, n. 2015, p. 381-386, 2015.

RODA, J. F. B.; LAUER, M. M.; RISSO, W. E.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? ***Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology***, v. 242, p. 110659, 2020.

SAAD-ALLAH, K. M.; ELHAAK, M. A. Hyperaccumulation activity and metabolic responses of *Solanum nigrum* in two differentially polluted growth habitats.

Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, v. 16, n. 3, p. 227-235, 2017.

SANTOS-SILVA, T. G.; MONTAGNER, C. C.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 58, p. 237-242. 2018.

SASMAL, B., MONDA, A. K., Phyto-sociological studies on *Pistia stratiotes* L. var. *cuneata* Engl. (Araceae) in Purba Medinipur District, West Bengal, India. **International Journal of Current Research**, v. 5, n. 2, p. 283-288, 2013.

SIMONATO, J. D.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RANDI, M. A. F.; CARVALHO, P. S. M.; MELETTI, P. C.; DE ASSIS, H. C. S.; BIANCHINIM A.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic toxicology**, v. 170, p. 31-41, 2016.

SFAKIANAKIS, D. G.; RENIERI, E; KENTOURI, M.; TSATSAKIS, A. M. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. **Environmental research**, v. 137, p. 246-255, 2015.

TAO, Q.; HOU, D.; YANG, X.; LI, T. Oxalate secretion from the root apex of *Sedum alfredii* contributes to hyperaccumulation of Cd. **Plant and Soil**, v. 398, n. 1-2, p. 139-152, 2016.

TESSER, M. E.; DE PAULA, A. A.; RISSO, W. E.; MONTEIRO, R. A.; SANTO PEREIRA, A. D. E.; FRACETO, L. F.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135332, 2020.

TRIPATHI, B. D.; UPADHYAY, A. R.; DWIVEDI, U. P.; SINGH, M. K.; DWIVEDI, A. K.; PANDEY, T.; PANDEY, A. K. Characterization of effluent of a feeder balancing dairy at Varanasi. **Adv. Biol. Res**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2000.

VASEEM, H; BANERJEE, T. K. Efficacy of phytoremediation technology in decontaminating the toxic effluent released during recovery of metals from polymetallic sea nodules. **International Aquatic Research**, v. 7, n. 1, p. 17-26, 2015.

VIANA, L. F.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. L.; DO AMARAL CRISPIM, B.; DE CARVALHO CAVALCANTE, D. N.; GRISOLIA, A. B.; LIMA-JUNIOR, S. E. The response of neotropical fish species (Brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 3, p. 476-485, 2018.

VICTOR, K. K.; SÉKA, Y.; NORBERT, K. K.; SANOGO, T. A.; CELESTIN, A. B.

Phytoremediation of wastewater toxicity using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*). **International Journal of phytoremediation**, v. 18, n. 10, p. 949-955, 2016.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDENI, B.; OLIVEIRA, L. F.; CABRERA, L. C.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 44-56, 2016.

WANG, N.; JIANG, M.; ZHANG, P.; SHU, H.; LI, Y.; GUO, Z.; LI, Y. Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio*. **Chemosphere**, v. 245, p. 125613, 2020.

WEBER, P.; BEHR, E. R.; KNORR, C. D. L.; VENDRUSCOLO, D. S.; FLORES, E. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 61-66, 2013.

WOOD, C. M., FARRELL, A. P., BRAUNER, C. J (Ed.). **Homeostasis and toxicology of essential metals**. Academic press, 2012.

YU, C.; PENG, X.; YAN, H.; LI, X.; ZHOU, Z.; YAN, T. Phytoremediation ability of *Solanum nigrum* L. to Cd-contaminated soils with high levels of Cu, Zn, and Pb. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 5, p. 1-10, 2015.

5. MANUSCRITO

A MACRÓFITA *Pistia stratiotes* ATENUA OS EFEITOS
GENOTÓXICOS E FISIOLÓGICOS DO COBRE PARA O
TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*?

Nicholas A. A. Pernambuco, Claudia B. R. Martinez
Laboratório de Ecofisiologia animal, Departamento de Ciências
Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná.

Este manuscrito foi preparado de acordo com as normas do periódico **Environmental Toxicology and Pharmacology** (<https://www.elsevier.com/journals/environmental-toxicology-and-pharmacology/1382-6689/guide-for-authors>)

Resumo

A fitorremediação, metodologia que utiliza plantas para remover ou imobilizar contaminantes, pode ser utilizada em ambientes contaminados por cobre. Entretanto, ainda poucos estudos correlacionam a fitorremediação em experimentos com peixes expostos a metais. Este trabalho analisou o potencial da macrófita *Pistia stratiotes* em atenuar os efeitos do cobre em juvenis do teleósteo *Prochilodus lineatus*. Foram realizados experimentos (24 e 96 h), com peixes expostos apenas à água (CTR); água e planta (CTRPi); à $15 \mu\text{gL}^{-1}$ Cu (Cu) e ao cobre e planta (CuPi). Foram coletadas amostras de sangue, brânquias, folhas, raiz e água para análise da concentração de cobre [Cu] e biomarcadores (genotóxicos, hematológicos, metabólico e de ionorregulação). Após 96 h de exposição, verificou-se 55% de mortalidade nos peixes expostos ao cobre, enquanto no grupo exposto ao metal na presença da planta a mortalidade foi reduzida para 30%. Além da mortalidade, efeitos subletais do cobre na glicemia e danos no DNA foram atenuados na presença da planta, que acumulou cobre nas raízes. Assim, conclui-se que *P. stratiotes* foi capaz de atenuar alguns dos efeitos do cobre para *P. lineatus*, indicando que esta planta pode atuar na fitorremediação de cobre, acumulando este metal em suas raízes.

Palavras-chave: Alface d'água; Biomarcadores; Fitorremediação; Metal; Peixe.

5.1. INTRODUÇÃO

Metais se destacam entre os compostos que estão presentes nas águas de rios e lagos, podendo causar efeitos adversos na biota aquática e até mesmo para seres humanos que acabam por as consumir (Saad-Allan e Elhahack 2015).

Alguns metais são considerados cofatores em diversos processos biológicos, dentre eles é possível citar o cobre (Cu) sendo imprescindível para o desempenho de funções biológicas, sendo encontrado em enzimas e outros compostos necessários ao funcionamento do organismo, na biossíntese de neurotransmissores e homeostase do ferro (Wood 2012).

O cobre possui ampla distribuição pela crosta terrestre, encontrado no território nacional em diversas concentrações em rios, como: 3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ no Rio Camaquã nos arredores de uma antiga mina de Cu, mesmo estando à 20 anos inativa (Weber et al., 2013); 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu na Bacia do Rio Bacanga (MA) (Pinheiro-Sousa et al., 2019) e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu da Bacia do Alto Rio Paraná (MS) (Viana et al., 2018); e o valor mais alto foi registrado no Rio Doce, no município de Mariana (MG), após o rompimento da barragem de mineração, em um ponto a jusante de um dique, alcançando valores de 1427 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Carvalho et al., 2018). Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a concentração máxima permitida de Cu dissolvido para águas doces de Classe 1 e 2 é de 9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para águas de classe 3 é de 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Brasil, 2005).

Os peixes são amplamente utilizados em experimentos, esses animais são utilizados em estudos de possíveis impactos gerados por poluentes em corpos de água, pois possuem especificidade de habitat e modo de alimentação (Authman et al., 2015). Estes animais também apresentam a capacidade de acumular tóxicos em seus tecidos (Simonato et al., 2016), assim auxiliando na descrição e nos estudos sobre contaminantes nos corpos aquáticos e os possíveis impactos decorrentes.

O teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), popularmente conhecido como curimatá ou curimba (Agostinho et al., 2003), habita desde rios até reservatórios, é considerado um excelente modelo biológico podendo ser utilizado para indicação da qualidade ambiental. Esta espécie já mostrou sensibilidade quando exposto ao Cu durante ensaios agudos (Mazon e Fernandes 1999; Nascimento et al., 2012), apresentando proliferação

de células ricas em mitocôndrias e células pavimentosas na brânquia (Mazon et al., 2002), aumento do hematócrito, contagem de células vermelhas e concentração de hemoglobina (Cerqueira e Fernandes 2002). Também foi observado estresse oxidativo e danos no DNA de células sanguíneas em *P. lineatus* expostos a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (Simonato et al., 2016).

Há estudos na literatura que analisam a utilização de plantas aquáticas como agentes naturais para remover ou imobilizar metais da água, os acumulando em suas células, processo conhecido como fitorremediação. Tais plantas são capazes de absorver metais, como Cu, tolerando-os ou concentrando-os em sua biomassa em altos níveis (Yu et al., 2015). Trata-se de uma metodologia de baixo custo, confiável e amigável ao ambiente (Ehsan et al., 2014; Tao et al., 2016).

A macrófita *Pistia stratiotes* se destaca como um possível agente fitorremediador. Pertencente à família Aracea, é uma planta aquática com raízes extensas (Cícero et al., 2007) e cobrir grandes áreas da superfície aquática (Sasmal e Monda 2013). Essa planta é capaz de remover de forma exemplar metais do ambiente, tais como Cu (Putra et al., 2015; Lakra et al., 2019), Pb (Putra et al., 2015; Lakra et al., 2019), Cr (Lakra et al., 2019) e Ni (Galal e Farahat, 2015).

Porém, mesmo que muitos estudos abordem o processo de fitorremediação de ambientes aquáticos, ainda existem poucos estudos que foquem na relação da fitorremediação de águas contaminadas por metais juntamente com a presença de peixes. Deste modo, faz-se necessário a realização de estudos como este, abordando o processo de fitorremediação de uma macrófita aquática em conjunto com uma espécie de peixe nativo (*P. stratiotes* e *P. lineatus*, respectivamente).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar o potencial da macrófita *P. stratiotes* (alface d'água) em atenuar os efeitos do cobre em juvenis do peixe dulcícola *P. lineatus* (curimba).

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Meio de exposição e delineamento experimental

Os meios de exposição foram preparados previamente, um dia de antecedência do início dos experimentos, em aquários de vidro de 10L, preenchidos com água desclorada e com aeração constante, para que posteriormente os peixes pudessem ser introduzidos. O contaminante também foi preparado previamente utilizando uma solução feita com Cu adquirido comercialmente e diluído em água destilada, visando obter uma solução estoque de concentração nominal $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu. Tal concentração foi baseada em estudos prévios (Pinheiro-Sousa et al., 2019; Viana et al., 2018), buscando também manter uma concentração efetiva próxima aos valores apresentados na resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005) para rios de classe 3, que permite uma concentração máxima de $13 \mu\text{g L}^{-1}$.

Foram realizados experimentos em tempos distintos, inicialmente um experimento de 24 horas de duração e posteriormente um de 96 horas de duração. Em cada tempo experimental foram utilizados 40 aquários de vidro de 10 L cada, preenchidos com água desclorada e mantidos com aeração constante. Em ambos experimentos foram estabelecidos quatro grupos amostrais, 10 aquários representando o grupo controle (CTR – contendo 1 exemplar de *P. lineatus* em cada aquário com água desclorada), 10 aquários representando o grupo controle na presença da planta (CTRPi – contendo 1 exemplar de *P. lineatus* e *P. stratiotes* em cada aquário com água desclorada), 10 aquários correspondendo ao grupo contaminante isolado (Cu – contendo 1 exemplar de *P. lineatus* em cada aquário em água desclorada e a concentração nominal de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu), e 10 aquários correspondendo ao grupo contaminante na presença da planta (CuPi – contendo 1 exemplar de *P. lineatus* e *P. stratiotes* em cada aquário em água desclorada e concentração nominal de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu). Exemplos de peixe e planta foram selecionados aleatoriamente (Figura 10). Durante os experimentos foram monitorados os dados de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água utilizando Horiba (Tabela 1).

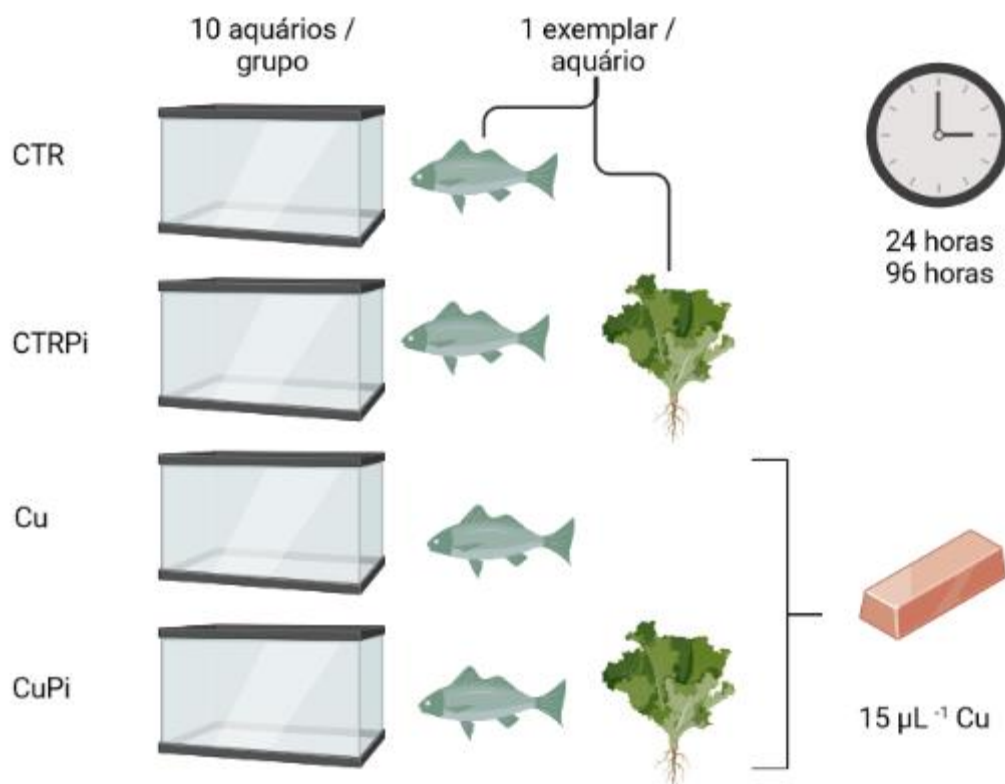


Figura 10 – Delineamento experimental proposto para execução dos experimentos em tempos distintos. Cada grupo experimental foi composto por 10 aquários, em cada um deles foi colocado aleatoriamente um exemplar de *P. lineatus*. Dentro dos grupos CTRPi e CuPi, foi colocada um exemplar de *P. stratiotes* também selecionado aleatoriamente. Totalizando 40 animais e 20 plantas por experimento.

Tabela 1 – Dados de temperatura, Oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água monitorados durante cada tempo experimental. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão (n = 24 h : 4; 96h : 8)

Tempo	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio (mg ⁻¹ L)	Condutividade (mS ⁻¹ cm)
24 h	22,28 \pm 0,07	7,91 \pm 0,16	6,17 \pm 0,35	0,107 \pm 0,003
96 h	22,88 \pm 0,05	7,85 \pm 0,24	6,58 \pm 0,27	0,115 \pm 0,006

Exemplares de *P. lineatus* e *P. stratiotes* foram adquiridos comercialmente. Ambos passaram por período de aclimação de ao menos 7 dias em laboratório, com temperatura e fotoperíodo do ambiente fixados (29 °C, 12 h claro / 12 h escuro). Os exemplares de peixe foram mantidos dentro de tanque de 300 L, contendo somente água desclorada e aeração constante, sendo alimentados com ração Guabi ®. A água foi renovada a cada 48 horas, e a alimentação

suspensa 24 horas antes do início dos experimentos. Os exemplares de planta passaram por processo de padronização, sendo separadas em relação ao número de folhas, peso total, diâmetro e comprimento das raízes (no máximo 5 cm). Após o processo de padronização das plantas, elas tiveram suas raízes lavadas para remoção de qualquer sujeira e em seguida foram colocadas dentro de caixas plásticas transparentes com aproximadamente 20 L de água desclorada em cada caixa.

5.2.2. AMOSTRAGEM

Após os períodos de exposição, os animais foram retirados dos aquários e imediatamente anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g L}^{-1}$) para que pudessem ser pesados e medidos (Tabela 2). Em seguida foi realizado a coleta de sangue através da veia caudal para a realização dos parâmetros plasmáticos e sanguíneos. Parte das amostras de sangue foram utilizadas para o preparo de lâminas que foram utilizadas no teste do cometa, quantificação do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e o restante das amostras foram centrifugadas (1870 g , 10 minutos , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para obtenção do plasma e armazenadas em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até momento das análises. Os peixes foram mortos através de secção medular para a coleta das brânquias, as quais foram mantidas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises fisiológicas. As brânquias foram homogeneizadas em tubos de homogeneização (envoltos por gelo) contendo tampão SEID para a realização de todas as análises.

Tabela 2 – Características biométricas dos exemplares de *Prochilodus lineatus* usados nos experimentos. Dados correspondem à média \pm desvio padrão.

Tempo	N	Peso (g)	Comprimento total (cm)
24 h	40	$64,9 \pm 2,81$	$18,21 \pm 0,25$
96 h	40	$67,65 \pm 4,57$	$18,46 \pm 0,22$

Após a exposição, as plantas também foram pesadas, medidas, tiveram o número de folhas mensurado e foram divididas em parte aérea e raiz, em seguida foram armazenadas em freezer em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tabela 3). Estes protocolos

foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL: n° 004.2021).

Tabela 3 – Características biométricas dos exemplares de *Pistia stratiotes* utilizados nos experimentos. Dados correspondem à média \pm desvio padrão.

Tempo	N	Peso (g)	Diâmetro (cm)	Nº de folhas	Raíz (cm)
24h	20	17,45 \pm 0,07	13,88 \pm 0,39	8,3 \pm 1,13	5
96h	20	29,3 \pm 4,1	14,01 \pm 0,49	7,7 \pm 0,042	5

5.2.3. Análise Genotóxica

Uma gota de sangue foi utilizada para análise dos danos em DNA por meio do ensaio alcalino do Cometa. Este ensaio envolve a etapa de lise celular, desnaturação do material genético e eletroforese em meio alcalino (pH > 13), para migração dos fragmentos de DNA, ocorrendo a formação de uma cauda proveniente da migração dos fragmentos de DNA e neutralização. As lâminas foram coradas com Gelred e examinadas ao microscópio de fluorescência. O dano no DNA foi quantificado visualmente em cada amostra, contabilizando aleatoriamente 300 células de acordo com o tamanho da cauda e classificadas em 4 classes (de 0 à 3). Para calcular o escore de danos, o número de células em cada classe foi multiplicado pela classe de dano a qual era presente, abrangendo de 0 (sem danos) até 300 (dano máximo). Os resultados foram expressos pela média dos valores de escore de danos de cada grupo em cada tempo experimental, baseado em trabalho de Singh et al (1988) e modificações por Alvim e Martinez (2019).

5.2.4. Análise Metabólica

Foi realizado a avaliação da concentração plasmática de glicose através do método enzimático da glicose-oxidase, utilizando kit comercial (Doles) em espectrofotômetro a 505 nm.

5.2.5. Análises Hematológicas

A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada através de teste colorimétrico de cianometahemoglobina (kit comercial, Labtest Diagnóstica,

Brasil) e mensurado utilizando espectrofotômetro Libra S32 (Biochrom, UK) a 540 nm.

O número de células vermelhas por mm^3 (RBC) foi determinado usando câmara de Neubauer em microscópio. Amostras de sangue (5 μL) foram inseridas em solução tampão (1 mL) contendo 3,8 g de citrato de sódio e 2 mL de formol 40% para conservação das células vermelhas em microtubos. Estes microtubos foram vertidos gentilmente para homogeneizar a solução, sem seguida uma gota foi pipetada e despejada na câmara e analisada em aumento 40x, contabilizando o número de células vermelhas presente dentro dos quatro quadrantes externos da câmara. Resultados foram obtidos através do seguinte cálculo: $N^\circ \text{ de células} = n^\circ \text{ médio} \times 25 \times 200 \times 10 / 1.000.000$ para cada amostra.

A concentração de sódio e potássio plasmático foi mensurado utilizando as amostras de plasma, diluídas 100x em água ultrapura (1 mL de água para 10 μL de plasma) em eppendorffs de 1 mL e a leitura foi feita em fotômetro de chama (DM-62, Digmed, Brazil). Para a leitura, padrões de Na^+ e K^+ (ambos 100mM) foram utilizados para calibração do fotômetro, as amostras de plasma foram submetidas rapidamente a vortex e em seguida foi realizada a leitura das amostras de plasma, assim obtendo as concentrações de cada amostra

5.2.6. Análise da atividade branquial das ATPases e anidrase carbônica

Amostras de brânquia foram armazenadas em 1 mL de tampão SEI (150 mM sacarose, 10 mM EDTA, 50 mM imidazol, pH 7,5) até o momento das análises. As amostras foram homogeneizadas (1g:5mL) utilizando tubos de homogeneização envoltos em gelo para que a temperatura das amostras fosse mantida e assim não gerasse perda da atividade enzimática e em seguida transferidas para microtubos (2 mL) e centrifugadas (1000 g, 20 minutos, 4 °C). Após processo de centrifugação, o sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NaKATP), $\text{H}^+\text{-ATPase}$ (HATP) $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ (CaATP) e Anidrase Carbônica (AC).

A atividade da NaKATP e HATP foram determinadas simultaneamente de acordo com Gibbs e Somero (1989), adaptado para microplaca. Os sobrenadantes foram diluídos para normalizar a concentração de proteínas da amostra para 1mg mL^{-1} . Uma reação de mistura (30 mM imidazol, 45 mM NaCl,

15 mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.4 mM MKCN, 1 mM frutose – 1,6 -difosfato, 2mM fosfoenolpiruvato, pH 9.0) foi feita e dividida em 3 partes iguais. O inibidor de HATP NEM 2 mM (N – Ethyl – D5 –malondeído) foi adicionado à 1/3; o inibidor de NaKATP Oubaína 2mM em 1/3 e nada foi adicionado em 1/3. Para que a atividade da H⁺ /NaK/ Total fossem medidas, respectivamente.

Um volume de 200 µL de solução de cada mistura de reação foi adicionado em quadruplicata para 5 µl de sobrenadante (12 poços, com volume final de 205 µL). A absorbância foi medida a cada minuto, durante um total de 15 minutos à 304 nm. NaKATP e HATP tiveram sua atividade estimada através do cálculo da diferença entre média contendo ou não Oubaína e a média contendo NEM ou não. A atividade foi expressa em umol ADP mg proteína⁻¹ h⁻¹.

A atividade da CaATP foi medida de acordo com o método de Vijayavel et al (2007) com modificações. 5 µl de amostra foram encubadas a 30 °C por 30 minutos em 100 µl de solução de reação (189 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 2mM Oubaína, pH 7.6) na ausência de ATP para determinar a concentração basal de fosfato inorgânico (Pi) e na presença de ATP (3 mM) para ocorrer reação. Reação foi parada deixando a placa em gelo por 10 minutos. Em seguida 200 µl de solução de coloração foi adicionada contendo 1:6 (volume / volume), 10% ácido ascórbico, 0.42% molibdato de amônio em 0,5 mM H₂SO₄ (Ames; 1966). Após 10 minutos, a formação de Pi foi mensurada em leitor de microplaca (ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 620 nm.

A atividade da Anidrase Carbônica (AC) foi determinada usando método de Vitale et al (1999). A taxa de reação catalisada foi quantificada adicionando água saturada com CO₂ ao sobrenadante e medindo o decaimento do pH por 20 segundos usando um pHmetro devido a liberação de H⁺ (Jenway 3510, EUA). A taxa de reação não catalisada foi quantificada usando tampão ao invés de sobrenadante. A atividade da enzima foi estimada segundo o cálculo: [taxa de reação catalisada / taxa de reação não catalisada].mg proteína⁻¹.

Para expressar a atividade das enzimas, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação das proteínas presentes na amostra com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância foi lida em leitora de microplacas (Bio-tek Instruments ELX 800) a 595 nm.

5.2.7. Concentração de Cu na água, planta e brânquias

Amostras de água filtrada (filtro de 0,45 μm , Millipore Millex HV/PVDF) foram coletadas de cada aquário para análise de cobre dissolvido. A coleta de água ocorreu nos tempos de 0 e 24 (no experimento de 24 h) e nos tempos de 0, 48 e 96 h (no experimento de 96 h), sendo que, em 48 h foram coletadas ao início e final da renovação. Para a determinação de cobre as amostras foram acidificadas com HNO_3 (65%) e armazenadas a 4°C para a análise das concentrações do metal.

Amostras de planta foram coletadas após o término de cada experimento e divididas entre parte aérea e raiz, em seguida foi feita a pesagem dos tubos em conjunto com o material biológico, adicionado HNO_3 e os tubos foram mantidos em estufa à 60°C para secagem. Em seguida as amostras foram armazenadas em -20°C até momento da análise.

Para estabelecer a concentração do metal nas brânquias, foi utilizada um arco branquial, passando pelo mesmo processo que as amostras vegetais (pesagem, adição de HNO_3 , secagem em estufa a 60°C por 48 horas e armazenamento em -20°C até análise).

A concentração de Cu na água e nas amostras digeridas das plantas e brânquias foi determinada por Espectrofotometria de Absorção Atômica de Alta Resolução (HR-CS GF AAS, Analytic Jena, Germany) no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

5.2.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados quanto à normalidade e homoscedasticidade de variância. Quando os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, testes paramétricos foram empregados (ANOVA para um fator e SNK como teste a posteriori) para comparação dos diferentes biomarcadores entre os grupos experimentais (CTR x CTRPi x Cu x CuPi) para cada tempo experimental. Caso contrário, os dados foram comparados por meio de testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e teste de Dunn). Foi adotado um nível de significância de 5%.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Mortalidade

No decorrer do experimento de 24 h, não foi observado casos de mortalidade em nenhum dos grupos experimentais. Porém, no decorrer do experimento de 96 h, o grupo Cu registrou mortalidade de 7 espécimes, enquanto o grupo CuPi teve 4 mortes. Devido a isso, para que fosse possível atingir o número mínimo de indivíduos para análise estatística, foi realizado outro experimento, no qual houve a mortalidade de 4 indivíduos no grupo Cu e de 2 indivíduos no grupo CuPi. Assim totalizando uma mortalidade de 55% no grupo Cu e 30% no grupo CuPi durante 96 h de exposição.

5.3.2. Análises Genotóxicas

Observou-se alterações no escore de dano em ambos os tempos amostrais mensurado pelo ensaio do Cometa. No experimento de 24 h, houve um aumento significativo no escore de danos do grupo Cu e CuPi em relação aos grupos CTR e CTRPi. Porém, ao comparar os grupos Cu e CuPi, não foi possível de observar diferença entre eles, possivelmente indicando que nesse período não foi possível observar efeitos do processo de fitorremediação proveniente de *P. stratiotes* (Figura 11).

No experimento de 96 h, os grupos controles também não foram diferentes entre si, porém, foi visto um aumento no escore de danos dos grupos expostos ao contaminante na presença e ausência da planta (Cu e CuPi, respectivamente), em relação aos controles. Verificou-se ainda diferença significativa entre os grupos expostos ao Cu, sendo que o grupo CuPi apresentou menor ocorrência de danos, quando comparado ao grupo Cu.

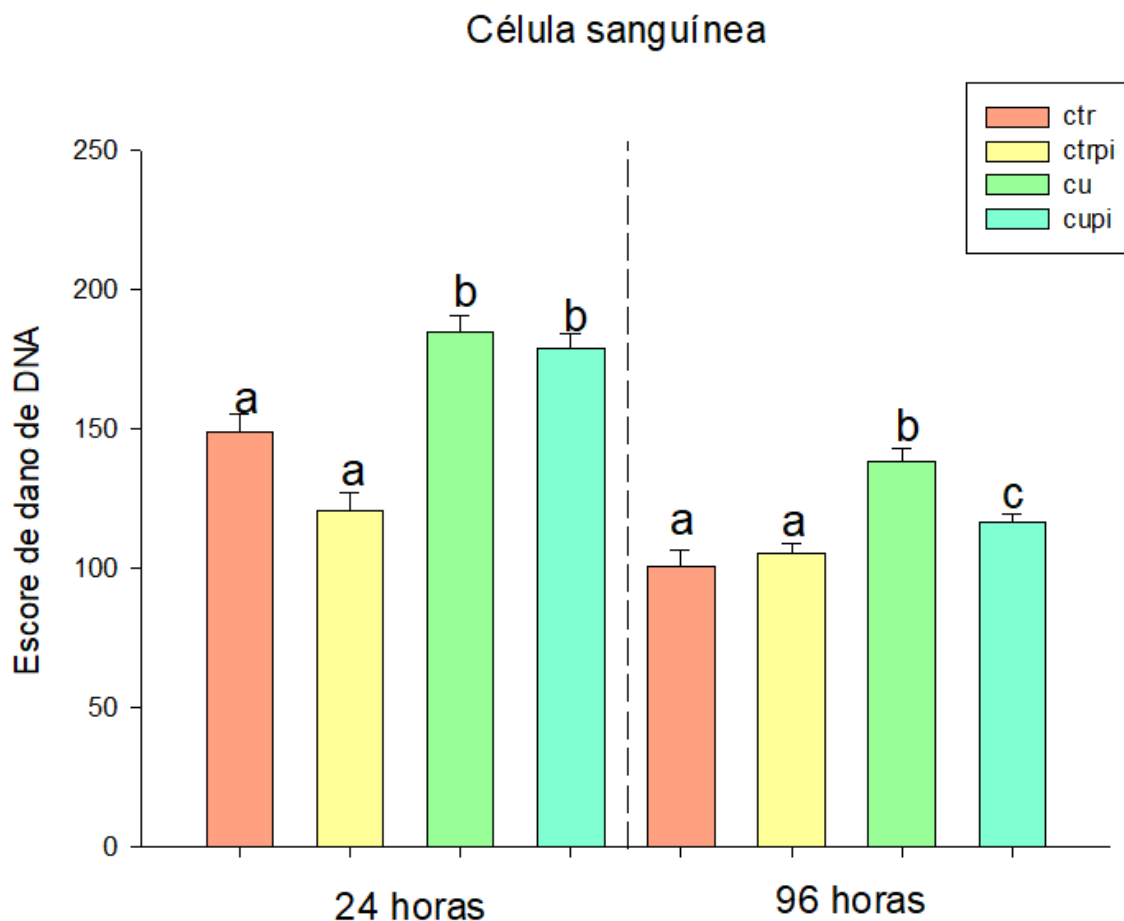


Figura 11 – Escore de danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRPI), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n= 8 - 13). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

5.3.3. Número de eritrócitos e concentração de Hemoglobina

Tanto a análise do número de eritrócitos (RBC) como da concentração de hemoglobina (Hb) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, em ambos os tempos de exposição. Demonstrando que estes biomarcadores não tiveram respostas significativas ao contaminante durante os experimentos (Figura 12).

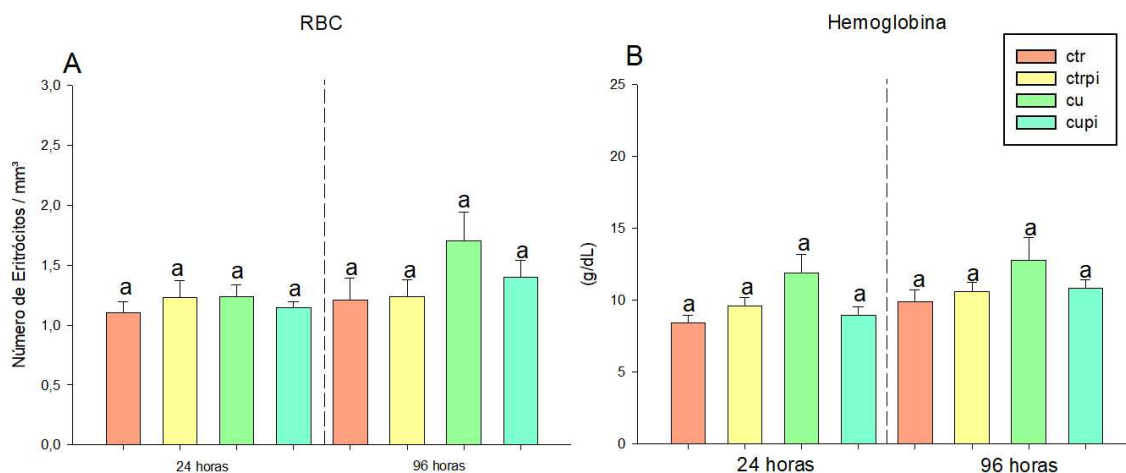


Figura 12 – Número de eritrócitos (A) e concentração de hemoglobina (B) no sangue de *P. lineatus* exposto apenas à água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRpi), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=8 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

Foi observado alterações significativas nas concentrações de Na^+ e K^+ após a exposição aos diferentes meios experimentais (Figuras 13 e 14). Após 24 h a concentração plasmática de Na^+ foi significativamente menor no grupo CTRpi em relação aos demais e significativamente maior no grupo Cu em relação aos demais, indicando que a planta na ausência do metal e o metal isoladamente afetaram de maneira diferente a disponibilidade de Na^+ plasmático. Já após a exposição de 96 h, foram observadas concentrações de Na^+ significativamente menores no grupo CTR em relação aos demais (Figura 13).

No caso da concentração de K^+ , na exposição de 24 h foi observado valor significativamente menor no grupo CTRpi em relação ao grupo CTR, não havendo diferença significativa dentro dos grupos expostos. Após 96 h, os grupos Cu e CuPi apresentaram concentrações de K^+ significativamente maiores em relação aos grupos controle, sendo que no grupo CuPi a concentração de K^+ foi significativamente maior em relação ao grupo Cu (Figura 14).

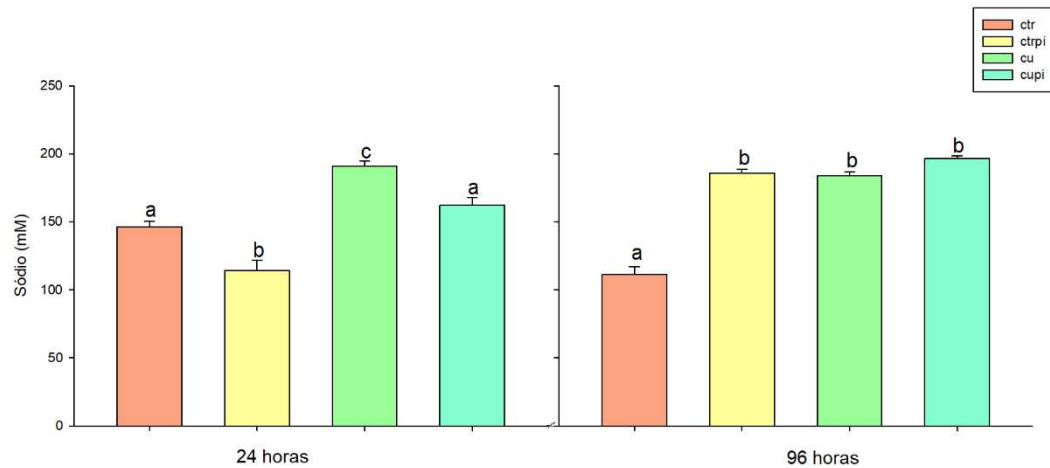


Figura 13 – Concentração plasmática de Na^+ de *P. lineatus* exposto apenas à água (CTR), expostos à água na presença de *P. stratiotes* (CTRPI), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n= 9 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

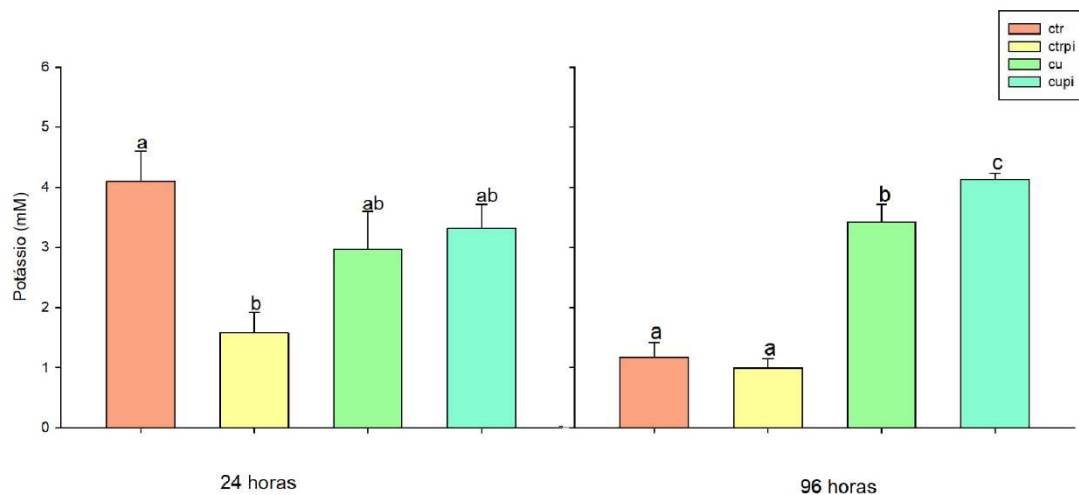


Figura 14 – Concentração plasmática de K^+ de *P. lineatus* exposto apenas à água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CuPi), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n= 9 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

5.3.4. Glicemia

Tanto no experimento de 24 h, quanto de 96 h, foi registrado valores de glicemia significativamente maiores nos grupos Cu e CuPi em relação aos grupos CTR e CTRPi, sendo que em 24 h a glicemia no grupo Cu foi significativamente maior quando comparado ao grupo CuPi (Figura 15).

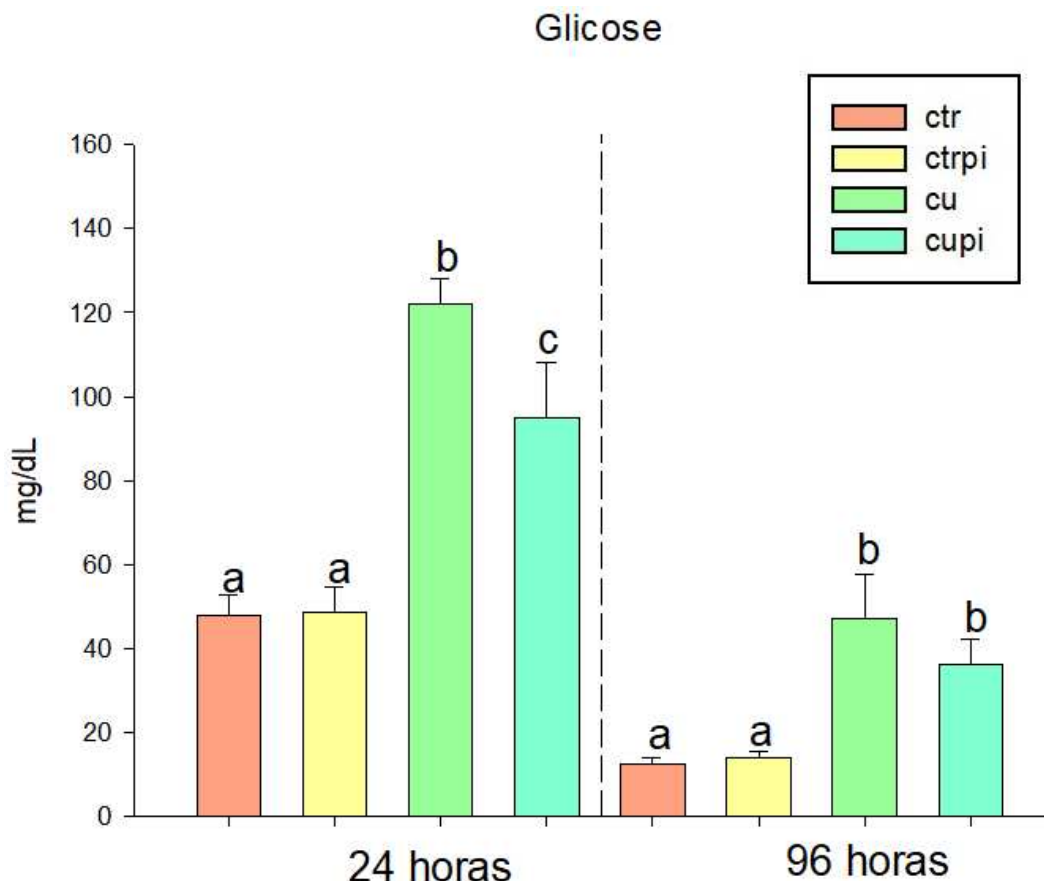


Figura 15 – Concentração de glicose plasmática de *P. lineatus* exposto apenas à água (CTR), expostos à água a presença da planta *P. stratiotes* (CTRpi), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

5.3.5. Atividade branquial das ATPases e anidrase carbônica

Ao avaliar a atividade da NaKATP durante exposição de 24 e 96 h, não foi registrada diferença significativa dentre os 4 grupos, indicando que o processo de fitorremediação não foi capaz de atenuar os efeitos tóxicos do metal sobre a atividade da NaKATP dos peixes (Figura 16).

A atividade da HATP foi significativamente maior no grupo CuPi, em ambos os tempos de exposição, em relação aos demais grupos. Mostrando que em

ambos os tempos, a presença da macrófita foi capaz de afetar diretamente a atividade dessa enzima quando exposta ao metal, registrando novamente o processo de fitorremediação (Figura 17).

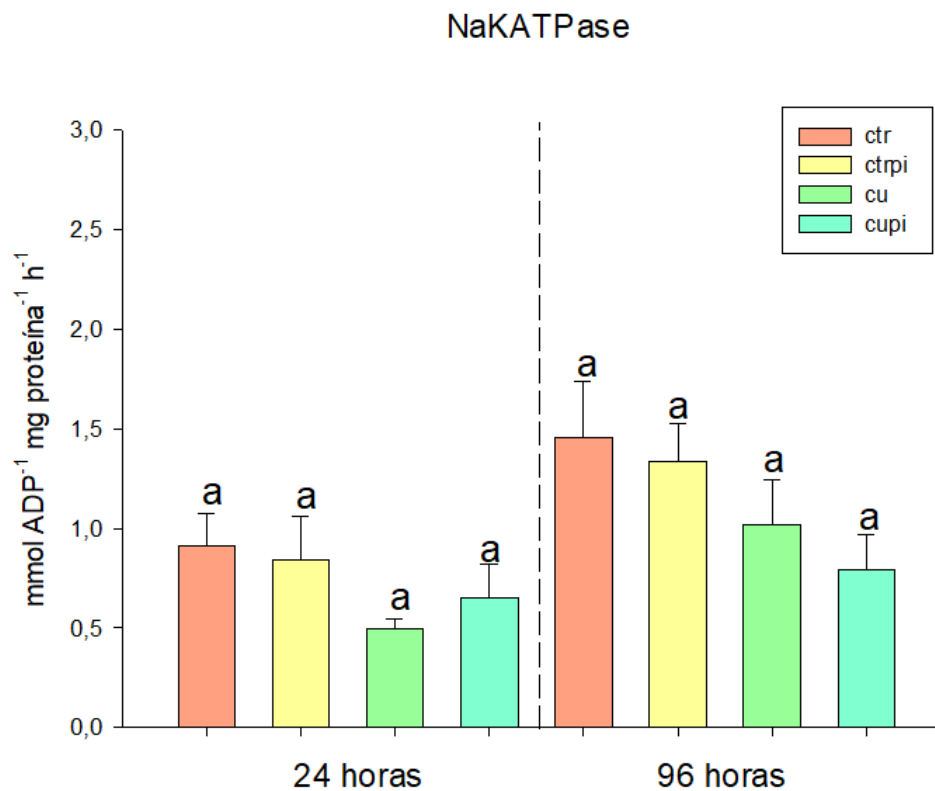


Figura 16 – Atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ de *P. lineatus* exposto a apenas água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRpi), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

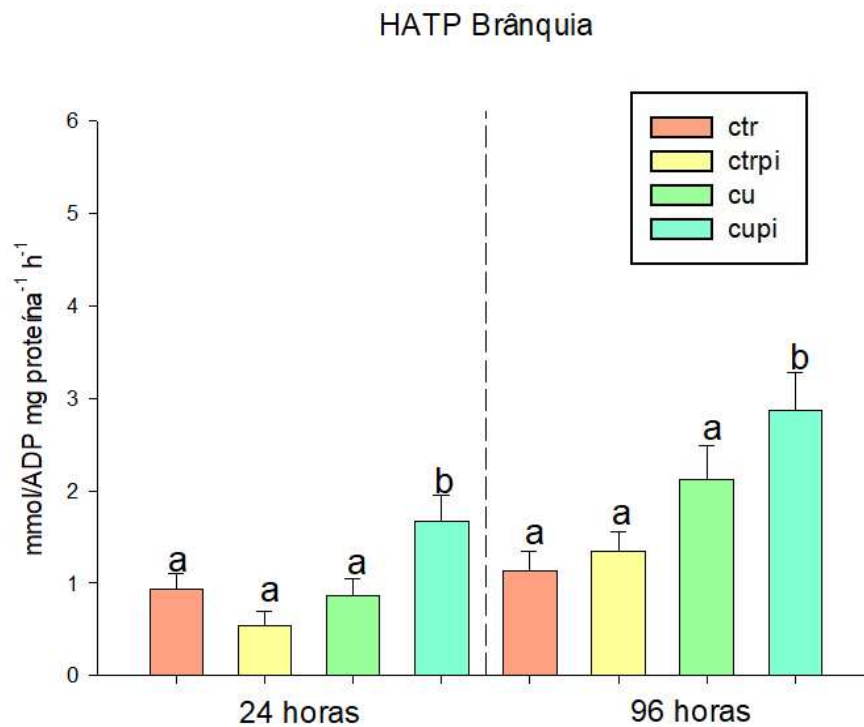


Figura 17 – Atividade da H⁺-ATPase de *P. lineatus* exposto a apenas água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRPI), expostos ao cobre (Cu) e expostos ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

Em relação a atividade da CaATP, no tempo de 24 h, foi registrado valor significativamente menor no grupo CuPi em relação a todos os demais.

Após 96 h de exposição não foram observadas diferenças significativas na atividade da CaATP entre os grupos. Indicando novamente que a presença da planta acabou alterando a atividade da CaATP inicialmente (Figura 18).

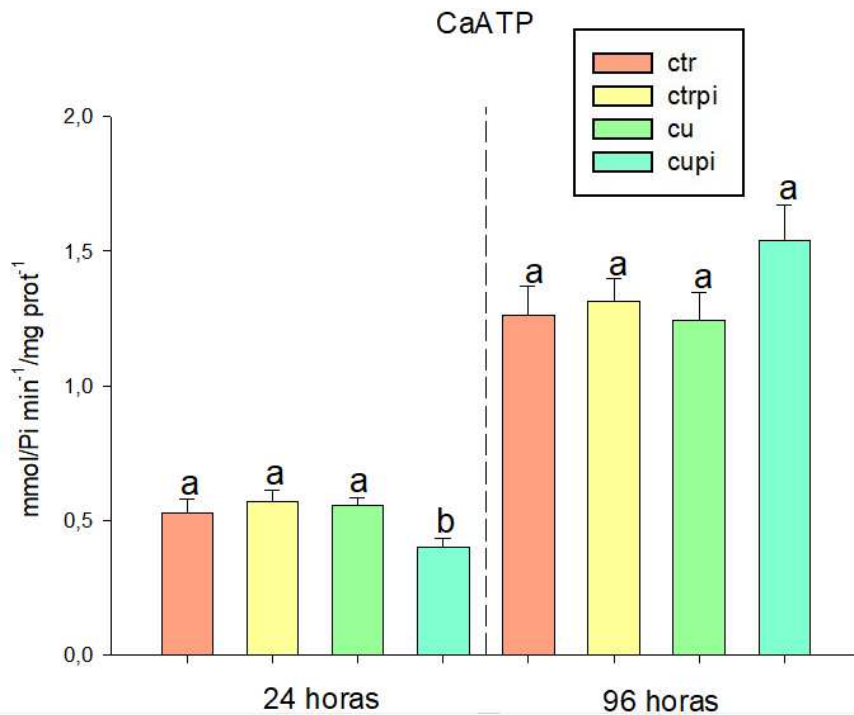


Figura 18 – Atividade da Ca^{2+} -ATPase de *P. lineatus* exposto a apenas água (CTR), expostos à água e na presença da planta *P. stratiotes* (CTRpi), expostos ao cobre (Cu) e ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

A atividade da anidrase carbônica, no tempo de 24 h, foi significativamente menor no grupo Cu quando comparado com os grupos CTRpi e CuPi mas igual ao grupo CTR. Já no tempo de 96 h, observou-se atividade da anidrase carbônica significativamente maior no grupo CTRpi em relação aos demais. Vale ressaltar que, em ambos os tempos de exposição, o grupo CTRpi apresentou valores elevados na anidrase carbônica (Figura 19).

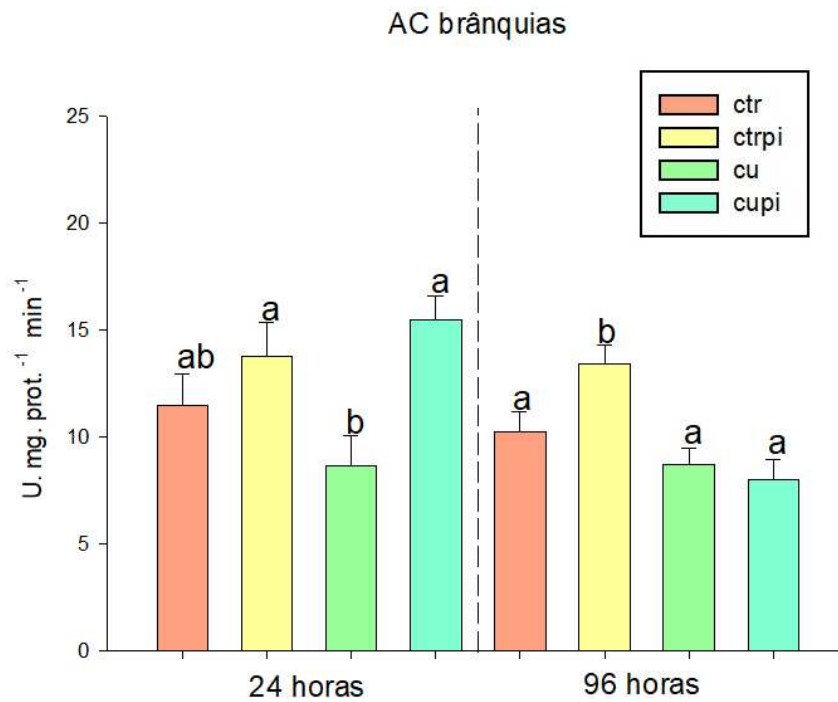


Figura 19 – Atividade da Anidrase Carbônica de *P. lineatus* exposto apenas à água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRPi), expostos ao cobre (Cu) e ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10 - 14). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

5.3.6. Cu na água e acúmulo na planta e nas brânquias

No experimento de 24 h (Tabela 4), no tempo zero (0 h) foram registrados valores de cobre dissolvido na água semelhantes nos grupos CTR (CTR e CTRPi), assim como nos grupos (Cu e CuPi: $p = 0,75$). Entretanto, após 24 h verificou-se redução significativa de cobre nos grupos Cu e CuPi em relação ao grupo aos valores no tempo 0 e ainda, valores menores de cobre no grupo CuPi em relação ao grupo Cu ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Concentrações de Cu dissolvido ($\mu\text{g L}^{-1}$) na água dos aquários do experimento de 24 h. Grupos controle (CTR), controle na presença da planta (CTRPi), grupo cobre (Cu) e grupo cobre na presença da planta (CuPi). Dados correspondem à média \pm desvio padrão (n).

[Cu] dissolvido ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Grupo	0 h	24 h	0 h x 24 h
CTR	5,93 \pm 2,43 (4)	4,25 \pm 1,33 (4)	
CTRPi	5,68 \pm 1,59 (5)	4,05 \pm 0,89 (5)	
Cu	14,07 \pm 1,04 (5)	11,90 \pm 0,38 (5)	p = 0,02
CuPi	13,81 \pm 1,35 (4)	8,61 \pm 0,65 (5)	p < 0,001
Cu x CuPi	p = 0,75	p < 0,001	

Analisando o experimento de 96 h (Tabela 5), no tempo zero não foi registrado diferença nos valores de concentração de cobre nos grupos Cu e CuPi, que se mantiveram próximas da concentração nominal. Entretanto, foi registrado uma redução significativa na [Cu] ao longo do experimento na água do grupo Cu (p<0,001). Comparações entre os grupos Cu e CuPi em 48 h e 96 h não foram possíveis em virtude de problemas nas análises de cobre nestas amostras.

Tabela 5 - Concentrações de Cu dissolvido ($\mu\text{g L}^{-1}$) na água dos aquários do experimento de 96 h. Grupos controle (CTR), controle na presença da planta (CTRPi), grupo cobre (Cu) e grupo cobre na presença da planta (CuPi). Dados correspondem à média \pm desvio padrão (n).

[Cu] dissolvido ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Grupos	0 h	48 h	96h
CTR	7,501 \pm 0,57 (2)	3,53 \pm 0,52 (2)	3,38 \pm 0,26 (2)
CTRPi	5,70 \pm 0,46 (2)	4,10 \pm 1,32 (2)	8,68 \pm 4,41 (2)
Cu	15,94 \pm 0,83 (5) ^a	11,36 \pm 0,15 (5) ^b	9,18 \pm 0,87 (5) ^c
CuPi	14,22 \pm 0,85 (5)	8,23 (1)	

Letras diferentes no grupo Cu indicam diferença significativa entre os tempos experimentais.

Analisando os dados de concentração de cobre na raiz em 24 h (Figura 20A), não foi possível observar diferença significativa entre os grupos CTRPi e CuPi, o mesmo foi observado ao analisar a concentração nas folhas (Figura 20B). No tempo de 96 h, foi registrada diferença significativa entre os grupos CTRPi e CuPi nas raízes (Figura 20A) tendo uma concentração maior de cobre

no grupo CuPi em relação ao controle (aproximadamente o dobro do valor registrado no grupo controle) nas raízes. Não houve diferença significativa entre estes grupos ao analisar a concentração nas folhas (Figura 20B), indicando que a planta foi capaz de obter e armazenar cobre apenas na raiz.

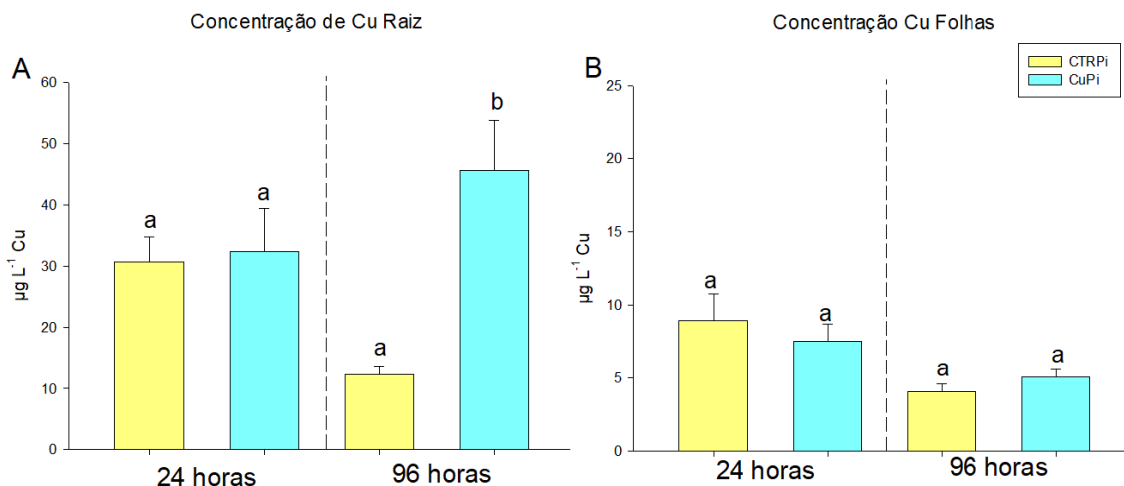


Figura 20 – Acúmulo de cobre nas raízes (A) e folhas (B) de *P. stratiotes* exposto apenas à água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRPi), expostos ao cobre (Cu) e ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 e 96 h. As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

Os dados de acúmulo obtidos nas brânquias no tempo de 24 h (Figura 21A) indicam valores significativamente maiores nos grupos Cu e CuPi em relação aos grupos controles, porém não foi registrado diferença significativa entre os grupos Cu e CuPi. Já no tempo de 96 h (Figura 21B) foi registrada diferença significativa entre o grupo CuPi em relação aos grupos controle, porém não foi observado diferença significativa entre os grupos expostos ao cobre. Indicando que de alguma forma a presença da planta resultou em maior concentração de cobre nas brânquias dos animais após 96 horas de exposição.

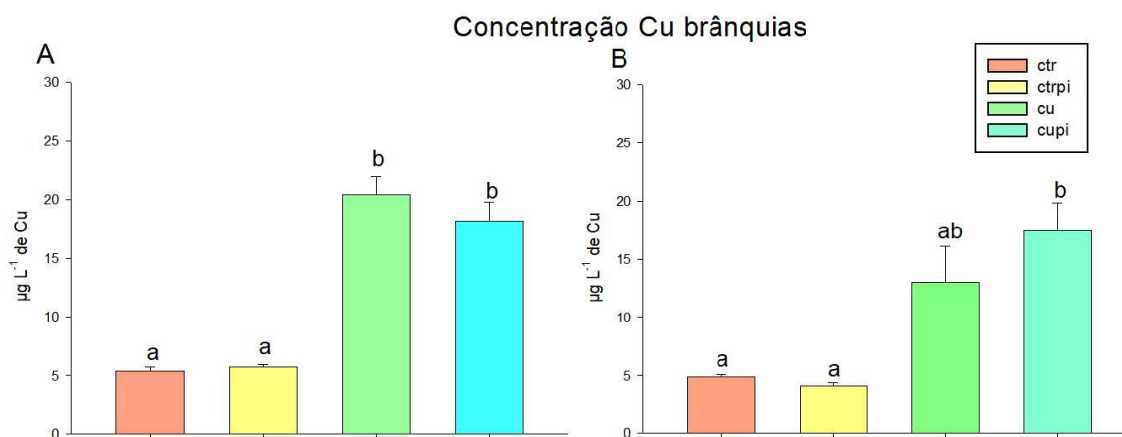


Figura 21 – Acúmulo de cobre nas brânquias em espécimes de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR), expostos à água na presença da planta *P. stratiotes* (CTRPI), expostos ao cobre (Cu) e ao cobre na presença de *P. stratiotes* (CuPi), durante 24 (A) e 96 h (B). As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n=10). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, considerando-se um mesmo tempo experimental.

5.4. DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar se o processo de fitorremediação proporcionado pela macrófita *P. stratiotes* é capaz de atenuar os possíveis efeitos gerados pela contaminação de Cu sobre o teleósteo neotropical *P. lineatus*, conhecido por sua sensibilidade a este metal. Para isso foram feitas análises utilizando diferentes biomarcadores para melhor entender os efeitos gerados em meio com metal isolado e em conjunto com a planta.

Ao avaliar a taxa de mortalidade do grupo exposto isoladamente ao Cu, foi registrada uma mortalidade de 55% dos animais, enquanto, ao avaliar os animais exposto ao Cu juntamente à planta foi observado 30% de mortalidade. Carvalho e Fernandes (2006) relataram uma CL_{50} (pH 8; à 22°C) para essa espécie de 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu dissolvido na água após 96 h, com isto, era esperado que casos de mortalidade já que o valor utilizado neste estudo (15 $\mu\text{g L}^{-1}$) estão próximos ao relatado. Confirmando a hipótese de que a planta *P. stratiotes* tem potencial de atenuar os efeitos do cobre sobre exemplares juvenis de *P. lineatus*.

Estes resultados também estão de acordo com o trabalho de Victor et al. (2016) que expuseram exemplares de *Sarotherodon melanotheron* à Zn, Cd, Cr e Cu em valores iguais às respectivas CL_{50} , juntamente com exemplares de *P. stratiotes* e *E. crassipes*, visando avaliar a fitorremediação. Estes autores

verificaram maior longevidade que a estipulada pelas respectivas CL_{50} dos peixes expostos aos metais em conjunto às plantas, assim comprovando a eficácia da fitorremediação.

Nas concentrações de cobre dissolvido na água após 24 h foi observada diferença entre os grupos Cu e CuPi, havendo redução de 15% e 37% respectivamente em comparação com o tempo inicial. Estes dados mostram que a planta foi eficaz em obter e armazenar cobre em seu tecido, ilustrando o processo de fitorremediação. Analisando o tempo de 96 h, também foi registrado decaimento na concentração de cobre na água a partir de 48 h no grupo Cu. Entretanto, em virtude de problemas nas análises de cobre, não foi possível obter resultados suficientes para comparar os grupos Cu e CuPi nos tempos de 48 e 96 h.

P. stratiotes já é estabelecida por possuir capacidade de acumulador de metais, devido isso os dados obtidos para concentração de cobre na água, estão de acordo com a tese de que a fitorremediação foi eficaz. A macrófita apresenta resistência ao estresse proveniente da contaminação, incluindo ajustes visando reestabelecer seu balanço metabólico (Li et al., 2022). *P. stratiotes* comumente realiza fitorremediação através de fitoestabilização, na qual os contaminantes são imobilizados pela adsorção ou acúmulo nas raízes ou por precipitação no interior da zona radicular e rizofiltração, a qual, as raízes adsorvem ou absorvem os contaminantes precipitados (Jeevanantham et al., 2019).

O decaimento na concentração de cobre nos meios de exposição em ambos os tempos, está correlacionado com a obtenção e acúmulo do contaminante nos tecidos vegetais e nas brânquias dos animais. Após 24 h de experimento foi registrado redução significativa de cobre nos grupos Cu e CuPi em relação ao tempo 0 e em relação ao grupo CuPi e Cu ($p < 0,001$). Analisando o tempo de 96 h foi registrado uma redução na concentração de cobre dentro do grupo Cu durante o experimento.

Com base no acúmulo no tecido vegetal, é possível dizer que como os exemplares de *P. stratiotes* tiveram maior concentração de cobre em suas raízes quando comparados as folhas, em ambos os tempos experimentais, especialmente no tempo de 96 h, havendo aumento significativo na concentração de cobre nas raízes do grupo exposto ao contaminante (CuPi) em relação ao grupo controle. Deve ser ressaltado que houve perda de suas raízes

durante o experimento, o que pode ser devido à formação de um meristema de abscisão no ponto de inserção da raiz no caule, promovendo a queda das raízes (Vesely et al., 2012; Li et al., 2022). Este resultado também está de acordo com os apresentados por Odjeba e Fasidi (2004), que expuseram exemplares de *P. stratiotes* durante período prolongado à 1 mM de Cu e observaram maiores concentrações nas raízes em relação as folhas. Além disso, estes mesmos autores afirmaram que o alongamento das raízes e a habilidade de *P. stratiotes* de desenvolver novas raízes foi reduzida durante exposição aos metais.

Em relação aos dados obtidos nas análises genotóxicas, espera-se um caso de estresse oxidativo em resposta à exposição ao Cu (Simonato et al., 2016), o qual é iniciado rapidamente durante a exposição, podendo resultar em oxidação do DNA, proteínas e lipídios quando a capacidade antioxidante celular é ultrapassada. Existem estudos que relatam dano no DNA de células vermelhas de peixes expostos a concentrações baixas de Cu (Gabbianelli et al., 2003; Santos et al., 2010). Resultados semelhantes foram vistos no trabalho de Simonato et al., 2016, no qual o escore de danos em eritrócitos foi 147% e 220% maiores quando comparados com o grupo controle em peixes exposto a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu, respectivamente. Segundo Roda et al (2020), exposições a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu durante os mesmos períodos de exposição, também causaram aumento nos danos ao DNA em *P. lineatus*.

Durante a exposição de 96 h, também foi possível observar aumento no escore de danos no DNA dos grupos expostos ao contaminante de forma isolada e na presença da planta. Outro fator importante de se destacar dentro dessa análise é a diferença significativa obtida ao comparar os grupos Cu e CuPi em 96 h de exposição, indicando que o processo de fitorremediação está ocorrendo no grupo CuPi e assim atenuando os efeitos do metal, consequentemente reduzindo o dano molecular. Este processo parece ser dependente do tempo, pois não foi possível observar o mesmo resultado no período de 24 h.

Não foi observada diferenças significativas, em ambos os tempos de exposição, para a concentração de hemoglobina. Ao analisar o número de eritrócitos (RBC), também não foi visto diferença significativa em ambos os tempos de exposição.

O aumento na concentração de glicose plasmática observado nos grupos expostos ao Cu, isoladamente e em conjunto com a planta em ambos os tempos

estão diretamente ligados ao fato que os animais tiveram sua alimentação suspensa 24 h antes do início de todos os experimentos, visando padronizá-los. Ressaltando também que foi observado um consumo dessa reserva energética com o decorrer do tempo, atendendo as demandas metabólicas dos organismos e também como uma resposta a presença do metal na água. Esta está relacionada com a produção e liberação de adrenalina e noradrenalina, envolvidas na resposta primária de estresse, que prepara o organismo para a chamada “luta ou fuga”, para que o animal consiga sair do ambiente estressor. Para isso, como é exigido uma demanda energética maior, as células inter-renais produzem cortisol, estimulando a síntese de glicose no fígado a partir de aminoácidos e ácidos graxos (gliconeogênese) levando a hiperglicemia. Os valores da concentração de glicose no tempo de 96 h apresentaram-se menores em relação aos obtidos em 24 h, indicando que o aumento inicial da glicemia acaba decaindo com o tempo, sendo utilizada como substrato para as reações enzimáticas do metabolismo. Porém, Roda et al (2020), mostrou que exemplares de *P. lineatus* após exposição de 96 h isoladamente ao Cu e juntamente com microplástico causaram aumento na glicemia dos animais.

As brânquias dos peixes são o primeiro órgão envolvido na regulação osmo-iônica (Evans et al., 2005), são constituídas por um epitélio extremamente sensível, dinâmico e metabolicamente ativo, responsável pelas trocas gasosas, regulação iônica e liberação de excretas nitrogenadas. Teleósteos dulcícolas são hiperosmóticos em relação ao meio que os circunda, logo, o epitélio das brânquias depende diretamente de transporte ativo para obtenção de íons, como é o exemplo das enzimas NaKATP, HATP e CaATP.

O Cu é conhecido como tóxico ionorregulador, que afeta a função destas enzimas (Viarengo et al., 1993), afetando diretamente na homeostase do sódio, afetando também absorção de cloreto e excreção de bases nitrogenadas (Grosell et al., 2002). A absorção de sódio através das brânquias é essencial para qualquer animal de água doce (Grosell et al., 2002), servindo para compensar a perda difusiva de sódio de seus fluidos extracelulares mais concentrados (sódio extracelular varia de 100 - 200 mM) em relação ao meio diluído que os circunda (concentração normalmente < 1 mM).

Laurén e McDonald (1985) estabeleceram que o cobre gera um distúrbio no balanço de sódio caracterizado por uma redução no influxo, juntamente com

aumento do efluxo de sódio em brânquias de Truta Arco-íris, relacionado à substituição de cálcio por cobre nas zonas de oclusão branquial (responsáveis parcialmente por controlar a permeabilidade do epitélio branquial). Laurén e McDonald (1987) também estabeleceram que a obtenção de sódio é afetada como resultado de uma inibição competitiva (diminuição na afinidade) e não competitiva (diminuição da capacidade máxima) após um período de 24 horas de exposição ao Cu.

Por outro lado, Grosell e Wood (2002) relataram que após 2 h de exposição a baixas concentrações de cobre foi observado redução na afinidade de transporte de sódio, indicando interação competitiva entre sódio e cobre, gerando uma tendência de aumento na capacidade máxima de transporte de sódio, ao invés de redução no tempo de 24 h.

Um dos principais componentes no processo de transporte iônico trans epitelial é a NaKATP, localizada na membrana basolateral, realizando a troca de Na^+ intracelular por K^+ extracelular em proporção de 3:2, polarizando a camada intracelular, formando assim um gradiente eletroquímico que favorece a entrada de sódio através da membrana apical. O sódio entra através da membrana apical em troca de H^+ ou de amônio, através de um trocador sódio-próton, ou ainda pelo canal apical de sódio (Grosell e Wood, 2002).

Durante o atual estudo não foram observadas alterações significativas na atividade da NaKATP em ambos os tempos amostrais, porém é importante destacar que houve diferença na concentração de Na^+ plasmático no grupo Cu no tempo de 24 h e nos grupos CTRPi, Cu e CuPi após 96 h de exposição. Estes resultados corroboram parcialmente os de Tesser et al. (2020), que não registraram inibição de NaKATP e alterações no nível plasmático de Na^+ após exposição a $11 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu, sendo considerado que a concentração estava abaixo do limiar necessário para causar alteração do funcionamento desta enzima. Essa estabilidade iônica foi atribuída à hiperplasia das células ricas em mitocôndrias, também relatadas em seu estudo, sendo uma resposta comum em situação adversa para manter o balanço de Na^+ e Ca^{2+} (McDonald e Wood, 1993).

É válido ressaltar que neste estudo foi avaliado a atividade da HATP, para a qual foi registrada uma maior atividade no grupo CuPi, após 24 e 96 h quando comparado com o grupo Cu. Isto deveria gerar um aumento do nível de Na^+ no

grupo CuPi, porém este foi menor em relação ao grupo Cu no tempo de 24 h e foram estatisticamente iguais ao grupo CTRPi e Cu no tempo de 96 h.

A HATP apical promove a extrusão de prótons para a água, aumentando assim o gradiente elétrico, favorecendo a entrada de Na^+ para células brânquias através de canais de Na^+ . Dentro da célula, Na^+ é bombeado em sentido ao sangue através de NaKATP basolateral, em troca de K^+ (Grosell et al., 2002).

A atividade da HATP pode indicar que em ambos os tempos, um processo de compensação dos efeitos tóxicos do cobre através da fitorremediação, observando aumento da sua atividade, enquanto a atividade da NaKATP não apresentou alterações. Pois a HATP possui papel de catalisar o movimento transmembrana de substâncias, criando gradientes eletroquímicos na membrana plasmática, que são usados para conduzir processos de transporte secundário, aumentando a taxa de obtenção de Na^+ para dentro da célula. Este resultado pode justificar o aumento na concentração de Na^+ plasmático, já que houve aumento da atividade da HATP apical no grupo CuPi, conseqüentemente favorecendo o aumentando da obtenção de Na^+ .

A entrada de Na^+ ocorre em troca de prótons, provenientes da hidratação do dióxido de carbono através da anidrase carbônica, facilitando a conversão de dióxido de carbono em prótons e bicarbonato (Perry, 1986), fornecendo contra íons para a obtenção de sódio e cloreto, respectivamente. A anidrase carbônica também gera substrato para troca de cloreto-bicarbonato que ocorre através na membrana apical, excretando bicarbonato em troca da entrada de cloreto (Perry et al., 1984). No presente estudo a atividade da anidrase carbônica das brânquias apresentou diminuição no grupo Cu após 24 h de exposição quando comparada com os demais grupos, enquanto a atividade dessa enzima permaneceu inalterada no grupo CuPi, indicando a ocorrência do processo de fitorremediação dentro deste grupo. Porém, após 96 h de exposição, não houve diferença significativa entre os grupos expostos, porém, foi observado uma diminuição da atividade dessa enzima no grupo CuPi em relação ao grupo CTRPi. Segundo Grosell e Wood (2002) qualquer alteração na atividade da anidrase carbônica proveniente de exposição ao cobre, resulta na redução do transporte de sódio pela brânquia (influenciando diretamente no trocador sódio-próton e na HATP).

A obtenção de Ca^{2+} ocorre principalmente através de células ricas em mitocôndria, através do transporte passivo de íons pelo canal apical de Ca^{2+} ,

seguido por transporte ativo para o sangue pela CaATP e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Perry, 1997). Shephard e Simkiss (1978) descobriram que íons Cu inibem a CaATP nas brânquias de *Rutilus rutilus in vitro* e promovem a proliferação dessa enzima *in vivo*.

No presente trabalho, foi observada uma diminuição significativa da atividade da CaATP dentro do grupo CuPi após 24 h de exposição. Isso não foi registrado no tempo de 96h, apresentando valores significativamente semelhantes neste tempo. Indicando que a presença da planta alterou de alguma forma atividade dessa enzima no tempo de 24 h.

5.5. CONCLUSÃO

Conclui-se que *P. lineatus* apresentou danos subletais e letais quando exposto a concentrações de cobre próximas a sua CL_{50} . Após 96 h de exposição, verificou-se 55% de mortalidade nos peixes expostos ao cobre, enquanto no grupo exposto ao metal na presença da planta a mortalidade foi reduzida para 30%. Além da mortalidade, efeitos subletais do cobre na glicemia, danos no DNA, atividade branquial da HATP e AC foram atenuados na presença da planta, que acumulou cobre nas raízes. Assim, com base nos registros de mortalidade e nos biomarcadores analisados, conclui-se que *P. stratiotes* foi capaz de atenuar alguns dos efeitos do cobre para *P. lineatus*, indicando que esta planta pode atuar na fitorremediação de cobre, acumulando este metal em suas raízes.

5.6. AGRADECIMENTOS

Ao professor Adalto Bianchini e Patrícia G. Costa, da Universidade Federal do Rio Grande, pela realização das análises de concentração de cobre na água e material biológico. À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado para NAA Pernambuco. Ao CNPq pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa para CBR Martinez (Processo 307146/2019-7).

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, S. I. M., Costa, P. G., Bianchini, A. 2018. Metal accumulation and expression of genes encoding for metallothionein and copper transporters in a chronically exposed wild population of the fish *Hyphessobrycon luetkenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 211: 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.05.008>
- Adebayo, A. A., Briski, E., Kalaci, O., Hernandez, M., Ghabooli, S., Beric, B., Chan, F. T., Zhan, A., Fifield, E., Leadley, T., Mac Isaac, H.J. 2011. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes*) in the Great Lakes: Playing with fire? *Aquatic Invasions* 6(1): 91-96. <https://doi.org/10.3391/ai.2011.6.1.11>
- Agostinho, A. A., Harumi, C. G., Suzuki, I., Júlio Jr., H. F. 2003. Migratory fish of the Upper Paraná River Basin. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A (Eds). *Migratory fishes of South America*. World Fisheries Trust: Victoria, BC, Canada.
- Alikasturi, A. S., Kamil, M. Z. A. M., Shakri, N. A. A. M., Serit, M. E., Rahim, N. S. A., Shaharuddin, S., Anuar, M. R., Radzi, A. R. M. 2019. Phytoremediation of copper in mineral, distilled and surface water using *Limnocharis flava* plant. *Materials Today: Proceedings*, 19: 1489-1496. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.173>
- Alvim, T. T.; dos Reis Martinez, C. B. 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842: 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>
- Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.C.; Mouneyrac, C. (Ed.). 2015. *Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks*. Academic press.
- Antiochia, R.; Campanella, L., Ghezzi, P., Movassaghi, K. 2007. The use of vetiver for remediation of heavy metal soil contamination. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(4): 947-956. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1268-1>

- Arslan, Ö. Ç., Boyacıoğlu, M., Parlak, H., Katalay, S., Karaalan, M. A. 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliağa Bay Turkey. *Marine pollution bulletin*, 94(1-2): 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.018>
- Atli, G.; Canli, M. 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology*, 20(8): 1861-1869. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0724-z>
- Authman, M. MN., Zaki, M. S., Khallaf, E. A., Abbas, H. H. 2015. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4): 1-13. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>
- Aravindhan, R., Rao, J. R., Nair, B. U. 2007. Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*. *Journal of hazardous materials*, 142(1-2): 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.07.058>
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Barroso, D. C., Pereira, R. S., Alessio, K. O., Baldisserotto, B., Val, A. L. 2020. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of copper affects branchial and hepatic phosphoryl transfer network of *Cichlasoma amazonarum*: Impacts on bioenergetics homeostasis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 238: 108846. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108846>
- Boisen, A. M. Z., Amstrup, J., Novak, I., Grosell, M. 2003. Sodium and chloride transport in soft water and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1618(2): 207-218. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.08.016>
- Bopp, S. K., Abicht, H. K., Knauer, K. 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic toxicology*, 86(2): 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.10.014>
- Brasil. 2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, (053): 58-63. Disponível em:

- <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: fev. 2021.
- Brasil. 2019. Agência Nacional das Águas. Conjuntura Recursos Hídricos Brasil. Disponível em: <<http://conjuntura.ana.gov.br/quantiquali>> Acesso em: jan. 2021
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buhlungu, B. P., Ntoni, N. J. 2015. Phytoremediation of cadmium-contaminated soils using *Leonotis leonurus*. *South African Journal of Botany*, (98): 207. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.03.144>
- Bury, N. R., Walker, P. A., Glover, C. N. 2003 Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of experimental biology*, 206(1): 11-23. <https://doi.org/10.1242/jeb.00068>
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2-3): 295-311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Cantanhêde, S. M., Castro, G. S., Pereira, N. J., de Pinhos Campos, J. S., Silvia, J., Tchaicka, L., Carvalho, R. N. F., Torres Jr. J. R. S., Santos, D. M. S. 2016. Evaluation of environmental quality of two estuaries in Ilha do Maranhão, Brazil, using histological and genotoxic biomarkers in *Centropomus undecimalis* (Pisces, Centropomidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20): 21058-21069. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7294-9>
- Carvalho Cavalcante, D. N.; Grisolia, A. B.; Lima-Junior, S. E. 2018. The response of neotropical fish species (Brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 75(3): 476-485. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0551-9>
- Castro, R. M. C., Vari, R. P. 2004. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian contributions to Zoology*. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.622>

- Cao, X., Wahbi, A., Ma, L., Li, B., Yang, Y. 2009. Immobilization of Zn, Cu, and Pb in contaminated soils using phosphate rock and phosphoric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3): 555-564. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.034>
- Cerqueira, C. C. C., Fernandes, M. N. 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(2): 83-91. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2164>
- Cheng, H., Chen, C., Wu, S., Mirza, Z. A., Liu, Z. 2017. Energy evaluation of cropping, poultry rearing, and fish raising systems in the drawdown zone of Three Gorges Reservoir of China. *Journal of Cleaner Production*, 144: 559-571. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.053>
- Chowdhury, M. J., Girgis, M., Wood, C. M. 2016. Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout: Time course, influence of calcium, unidirectional Na⁺ fluxes, and branchial Na⁺, K⁺ ATPase and V-type H⁺ ATPase activities. *Aquatic Toxicology*, 177: 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.009>
- Cícero, E. A. S., Pitelli, R. A., Sena, J. A. D., Ferraudo, A. S. 2007. Variabilidade genética e sensibilidade de acessos de *Pistia stratiotes* ao herbicida Glyphosate. *Planta Daninha*, Viçosa, 25(3): 579-587. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582007000300018>
- Craig, P. M., Hogstrand, C., Wood, C. M., McClelland, G. B. 2009. Gene expression endpoints following chronic waterborne copper exposure in a genomic model organism, the zebrafish, *Danio rerio*. *Physiological genomics*, 40(1): 23-33. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00089.2009>
- Craig, P. M., Wood, C. M., McClelland, G. B. 2010. Water chemistry alters gene expression and physiological end points of chronic waterborne copper exposure in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental science & technology*, 44(6): 2156-2162. <https://doi.org/10.1021/es902995q>
- Cronin, M. T. D., Dearden, J. C.; Dobbs, A. J. 1991. QSAR studies of comparative toxicity in aquatic organisms. *Science of the Total Environment*, 109: 431-439. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90198-N](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90198-N)
- De Boeck, G., De Smet, H., Blust, R. 1995. The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus*

- carpio*. Aquatic Toxicology, 32(2-3): 127-141. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00086-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00086-6)
- De Boeck, G., Vlaeminck, A., Balm, P. H., Lock, R. A., De Wachter, B., Blust, R. 2001. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: Interactions between Cu²⁺ and plasma cortisol elevation. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 20(2): 374-381. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200219>
- Dos Santos Carvalho, C.; Bernusso, V. A.; Fernandes, M.N. 2015. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). Aquatic Toxicology, 167: 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.003>
- Ehsan, S., Ali, S., Noreen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoor, M. B., Rizwan, M. 2014. Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. Ecotoxicology and environmental safety, 106: 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.007>
- Evans, D. H.; Piermarini, P. M.; Choe, K. P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological reviews, 85(1): 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1-2): 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fry, K. L., Wheeler, C. A., Gillings, M. M., Flegal, A. R., Taylor, M. P. 2020. Anthropogenic contamination of residential environments from smelter As, Cu and Pb emissions: Implications for human health. Environmental Pollution, 262: 114235. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114235>
- Gabbianelli, R., Lupidi, G., Villarini, M., Falcioni, G. 2003. DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequivalvis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 45(3): 350-356. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-2171-1>
- Galal, T. M.; Farahat, E. A. 2015. The invasive macrophyte *Pistia stratiotes* L. as a bioindicator for water pollution in Lake Mariut, Egypt. Environmental monitoring and assessment, 187(11): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4941-4>

- Galal, T. M., Shehata, H. S. 2015. Impact of nutrients and heavy metals capture by weeds on the growth and production of rice (*Oryza sativa* L.) irrigated with different water sources. *Ecological Indicators*, 54: 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.024>
- Galal, T. M., Shehata, H. S. 2015. Bioaccumulation and translocation of heavy metals by *Plantago major* L. grown in contaminated soils under the effect of traffic pollution. *Ecological Indicators*, 48: 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.08.013>
- Gagnon, A., Jumarie, C., Hontela, A. 2006. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 78(1): 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.004>
- Garbisu, C., Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource technology*, 77(3): 229-236. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00108-5)
- Gravel, A., Campbell, P. G. C., Hontela, A. 2005. Disruption of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in 1+ yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(5): 982-990. <https://doi.org/10.1139/f05-011>
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A. 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(1-2): 287-303. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00085-6)
- Guo, X., Liu, M., Zhong, H., Li, P., Zhang, C., Wei, D., Zhao, T. 2020. Potential of *Myriophyllum aquaticum* for phytoremediation of water contaminated with tetracycline antibiotics and copper. *Journal of Environmental Management*, 270: 110867. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110867>
- Hemachandra, C. K., Pathiratne, A. 2016. Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. *Ecotoxicology and environmental safety*, 131: 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.010>

- Hu, R. 2020. Pollution control and remediation of rural water resource based on urbanization perspective. *Environmental Technology & Innovation*, 20: 101136. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101136>
- Huang, C., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., Cheng, M., Wna, J., Hu, L., Zhang, Y. 2017. Effect of *Phanerochaete chrysosporium* inoculation on bacterial community and metal stabilization in lead-contaminated agricultural waste composting. *Bioresource technology*, 243: 294-303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.124>
- Jeevanantham, S. Saravanan, A., Hemavathy, R. V., Kumar, P. S., Yaashikaa, P. R., Yavaraj, D. 2019. Removal of toxic pollutants from water environment by phytoremediation: a survey on application and future prospects. *Environmental Technology & Innovation*, 13: 264-276. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.12.007>
- Lakra, K. C., Lal, B., Banerjee, T. K. 2019. Application of phytoremediation technology in decontamination of a fish culture pond fed with coal mine effluent using three aquatic macrophytes. *International journal of phytoremediation*, 21(9): 840-848. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1568384>
- Laurén, D. J., Mcdonald, D. G. 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology B*, 155(5): 635-644. <https://doi.org/10.1007/BF00694455>
- Leonel, A. G., Mansur, A. A. P., Mansur, H. S. 2020. Advanced Functional Nanostructures based on Magnetic Iron Oxide Nanomaterials for Water Remediation: A Review. *Water Research*, 190: 116693. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116693>
- Li, J., Lock, R. A., Klaren, P. H., Swarts, H. G., Stekhoven, F. M. S., Bonga, S. E. W., Flik, G. 1996. Kinetics of Cu²⁺ inhibition of Na⁺ K⁺-ATPase. *Toxicology Letters*, 87(1): 31-38. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(96\)03696-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(96)03696-X)
- Lim, J. M., Salido, A. L., Butcher, D. J. 2004. Phytoremediation of lead using Indian mustard (*Brassica juncea*) with EDTA and electronics. *Microchemical Journal*, 76(1-2): 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2003.10.002>
- Liu, B., Chen, L., Chen, S., Li, N., Zheng, H., Jin, K., Pang, H., Ma, Y. 2016. Subcellular Cd accumulation characteristic in root cell wall of rice cultivars with

- different sensitivities to Cd stress in soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(9): 2114-2122. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61227-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61227-8)
- Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood, C. M. 2002. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *Journal of Experimental Biology*, 205(2): 279-290. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.2.279>
- Kamunde, C. N., Pyle, G. G., McDonald, D. G., Wood, C. M. 2003. Influence of dietary sodium on waterborne copper toxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(2): 342-350. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220215>
- Kamunde, C. N., Niyogi, S., Wood, C. M. 2005. Interaction of dietary sodium chloride and waterborne copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): copper toxicity and sodium and chloride homeostasis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(2): 390-399. <https://doi.org/10.1139/f04-169>
- Karnaky Jr, Karl J. 1986. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. *American Zoologist*, 26(1): 209-224. <https://doi.org/10.1093/icb/26.1.209>
- Kim, W. K., Park, J. W., Lim, E. S., Lee, S. K., Kim, J., Kim, S., Lee, S. W., Choi, K. Jung, J. 2014. Tissue-specific antioxidant responses in pale chub (*Zacco platypus*) exposed to copper and benzo [a] pyrene. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92(5): 540-545,. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1213-x>
- Laurén, D. J., McDonald, D. G. 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology B*, 155(5): 635-644. <https://doi.org/10.1007/BF00694455>
- Laurén, D. J., McDonald, D. G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: biochemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(1): 105-111. <https://doi.org/10.1139/f87-013>
- Mahmoud, M. E., Osman, M. M., Yakout, A. A., Abdelfattah, A. M. 2019. Green nanosilica@ folic Acid (VB9) nanocomposite for engineered adsorptive water remediation of bivalent lead, cadmium and copper. *Powder Technology*, 344: 719-729. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.12.055>

- Malik, N., Biswas, A.K., Qureshi, T.A. 2010. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bophal. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160(1-4): 267-276. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0693-8>
- Malhotra, N., Ger, T. R., Uapipatanakul, B., Huang, J. C., Chen, K. H. C., Hsiao, C. D. 2020. Review of copper and copper nanoparticle toxicity in fish. *Nanomaterials*, 10(6): 1126. <https://doi.org/10.3390/nano10061126>
- Mazon, A. F., Cerqueira, C. C. C., Fernandes, M. N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research*, 88(1): 52-63. <https://doi.org/10.1006/enrs.2001.4315>
- Mazon, A. F., Fernandes, M. N. 1999. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 63(6): 797-804, 1999. <https://doi.org/10.1007/s001289901049>
- Mcdonald, D. G., Wood, C. M. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: *Fish ecophysiology*. Springer, Dordrecht: 297-321. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2304-4_12
- Mcgeer, J. C., Szebedinszky, C., Mcdonald, D. G., Wood, C. M. 2002. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(1-2): 147-160. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00084-4)
- Mueller, M. E., Sanchez, D. A., Bergman, H. L., Mcdonald, D. G., Rhem, R. G., Wood, C. M. 1991. Nature and time course of acclimation to aluminum in juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). II. Gill histology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(10): 2016-2027. <https://doi.org/10.1139/f91-240>
- Nascimento, C. R. B., Souza, M. M., Martinez, C. B. R. 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(3): 456-461. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.002>

- Odjegba, V. J., Fasidi, I. O. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*, 13(7): 637-646. <https://doi.org/10.1007/s10646-003-4424-1>
- Ossana, N. A., Eissa, B. L., Baudou, F. G., Catané, P. M., Soloneski, S., Ferrari, L. 2016. Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista River water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.046>
- Paquin, P. R., Gorsuch, J W., Apte, S., Batley, G. E., Bowles, K., Campbell, P. G. C., Delos, C. G., Toro, D. M. D., Dwyer, R. L., Galvez, F., Gensemer, R. W., Goss, G. G., Hogstrand, C., Janssen, C. R. Mcgeer, J. C., Naddy, R. B., Playle, R. C., Santone, R. C. Wu, K. B. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(1-2): 3-35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.11.005>
- Panfili, I., Bartucca, L. M., Ballerini, E., Bueno, D. D. 2017. Combination of aquatic species and safeners improves the remediation of copper polluted water. *Science of the Total Environment*, 601: 1263-1270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.003>
- Paschoalini, A. L., Savassi, L. A., Arantas, F. P., Rizzo, E., Bazzoli, N. 2019. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169: 539-550. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>
- Payan, P. 1978. A study of the $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange across the gill of the perfused head of the trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of comparative physiology*, 124(2): 181-188. <https://doi.org/10.1007/BF00689179>
- Pelgrom, S. M. G. J., Lock, R. A. C., Balm, P. H. M., Bonga, S. W. 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology*, 32(4): 303-320. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00004-N](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00004-N)
- Perry, S. F., Payan, P., Girard, J. P. 1984. Effects of Perfusate HCO_3^- and P CO_2 on Chloride Uptake in Perfused Gills of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41(12): 1768-1773. <https://doi.org/10.1139/f84-218>

- Perry, S. F. 1986. Carbon dioxide excretion in fishes. *Canadian journal of zoology*, 64(3): 565-572. <https://doi.org/10.1139/z86-083>
- Perry, S. F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual review of physiology*, 59(1): 325-347. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.325>
- Perry, S. F., Gilmour, K. M. 2006. Acid–base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology & neurobiology*, 154(1-2): 199-215. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.04.010>
- Picado, A., Mendonça, E., Silva, L., Paixão, S. M., Brito, F., Chuna, M. A., Leitão, S., Moura, I., Hernan R. 2008. Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 23(4): 466-472. <https://doi.org/10.1002/tox.20359>
- Pilgaard, L., Malte, H., Jensen, F. B. 1994. Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under normoxic and hypoxic conditions. *Aquatic Toxicology*, 29(3-4): 197-212. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)90068-X)
- Pinheiro-Sousa, D. B., Junior, A. R. T., Silva, D., Santos, R. L, Neta, R. N. F. C. 2019. A screening test based on hematological and histological biomarkers to evaluate the environmental impacts in tambaqui (*Colossoma macropomum*) from a protected area in Maranhão, Brazilian Amazon. *Chemosphere*, 214: 445-451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.146>
- Playle, R. C. 1998. Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment*, 219(2-3): 147-163. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00232-0)
- Pratas, J. Favas, P. J. C., Souza, R. D., Varun, M., Paul, M. S. 2014. Metais pesados em solos e vegetação espontânea da área de uma mina de chumbo, mina de Barbadalhos, Centro de Portugal. *Comunicações Geológicas*, 101: 1047-10150.
- Prasad, M. N. V. 2015. Geobotany–biogeochemical prospecting, *Journal of Palaeosciences*, 64(1-2): 113-116. <https://www.jpsonline.co.in/index.php/jop/article/view/106>
- Putra, R. S., Cahyana, F., Novarita, D. 2015. Removal of lead and copper from contaminated water using EAPR system and uptake by water lettuce (*Pistia*

- Stratiotes L.*). *Procedia chemistry*, 14(2015): 381-386.
<https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.052>
- Pyle, G. G., Kamunde, C. N., McDonald, D. G., Wood, C. M. 2003. Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 206(3): 609-618.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00114>
- Richards, J. G., Curtis, P. J., Burnison, B. K., Playle, R. C. 2001. Effects of natural organic matter source on reducing metal toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and on metal binding to their gills. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(6): 1159-1166.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620200604>
- Roda, J. F. B., Lauer, M. M., Risso, W. E., dos Reis Martinez, C. B. 2020. Microplastics and copper effects on the neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: Is there any interaction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 242: 110659.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110659>
- Saad-Allah, K. M., Elhaak, M. A. 2017. Hyperaccumulation activity and metabolic responses of *Solanum nigrum* in two differentially polluted growth habitats. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(3): 227-235.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.08.001>
- Šajna, N., Haler, M., Škornik S., Kaligarić, M. 2007. Survival and expansion of *Pistia stratiotes L.* in a thermal stream in Slovenia. *Aquatic Botany*, 87(1): 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.01.012>
- Santos-Silva, T. G., Montagner, C. C., dos Reis Martinez, C. B. 2018. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 58: 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.002>
- Sasmal, B., Monda, A. K. 2013. Phyto-sociological studies on *Pistia stratiotes L.* var. *cuneata* Engl.(Araceae) in Purba Medinipur District, West Bengal, India. *International Journal of Current Research*, 5(2): 283-288.
<http://inet.vidyasagar.ac.in:8080/jspui/handle/123456789/6043>
- Sciera, K. L., Isely, J. J., Tomasso, J. R., Klaine, S. J. 2004. Influence of multiple water-quality characteristics on copper toxicity to fathead minnows

- (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 23(12): 2900-2905. <https://doi.org/10.1897/03-574.1>
- Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., Tsatsakis, A. M. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. Environmental research, 137: 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
- Shephard, K., Simkiss, K. 1978. The effects of heavy metal ions on Ca²⁺ ATPase extracted from fish gills. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 61(1): 69-72. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(78\)90216-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(78)90216-X)
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175: 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Simonato, J. D., Mela, M., Doria, H. B., Guiloski, I. C., Randi, M A. F., Carvalho, P. S. M., Meletti, P. C., de Assis, H. C. S., Bianchini, A., dos Reis Martinez, C. B. 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Aquatic Toxicology, 170: 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.012>
- Siqi, W., Shuhe, W., Yanqiu, C., Mihajlov, L. 2017. Comparison of soybean cultivars enriching Cd and the application foreground of the low-accumulating cultivar in production. Polish Journal of Environmental Studies, 26(3): 1299-1304. <https://eprints.ugd.edu.mk/id/eprint/18157>
- Stagg, R. M., Shuttleworth, T. J. 1982. The effects of copper on ionic regulation by the gills of the seawater-adapted flounder (*Platichthys flesus* L.). Journal of Comparative Physiology, 149(1): 83-90. <https://doi.org/10.1007/BF00735718>
- Tao, S., Wen, Y., Long, A., Dawson, R., Cao, J., Xu, F. 2001. Simulation of acid–base condition and copper speciation in the fish gill microenvironment. Computers & Chemistry, 25(3): 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0097-8485\(00\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0097-8485(00)00083-8)
- Tao, Q., Hou, D., Yang, X., Li, T. 2016. Oxalate secretion from the root apex of *Sedum alfredii* contributes to hyperaccumulation of Cd. Plant and soil, 398(1-2): 139-152. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2651-x>
- Tao, S., Long, A., Xu, F., Dawson, R. W. 2002. Copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*) at various levels of pH.

- Ecotoxicology and Environmental Safety, 52(3): 221-226.
<https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2193>
- Tesser, M. E., de Paula, A. A., Risso, W. E., Monteiro, R. A., Santo Pereira, A. D. E., Fraceto, L. F., dos Reis Martinez, C. B. 2020. Sublethal effects of waterborne copper and copper nanoparticles on the freshwater Neotropical teleost *Prochilodus lineatus*: A comparative approach. Science of The Total Environment, 704: 135332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135332>
- Topal, A., Atamanalp, M., Oruç, E., Erol, H. S. 2017. Physiological and biochemical effects of nickel on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: assessment of nuclear factor kappa B activation, oxidative stress and histopathological changes. Chemosphere, 166: 445-452.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.106>
- Trevizo, C., Nirmalakhandan, N. 1999. Prediction of microbial toxicity of industrial organic chemicals. Water science and technology, 39(10-11): 63-69.
[https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00254-1)
- Tripathi, B. D., Upadhyay, A. R., Dwivedi, U. P., Singh, M. K., Dwivedi, A. K., Pandey, T., Pandey, A. K. 2000. Characterization of effluent of a feeder balancing dairy at Varanasi. Adv. Biol. Res, 18(1): 1-10.
- Viana, L. F., Suárez, Y. R., Cardoso, C. A. L., do Amaral Crispim, B., de Carvalho Cavalcante, D. N., Grisolia, A. B., Lima-Junior, S. E. 2018. The response of neotropical fish species (Brazil) on the water pollution: metal bioaccumulation and genotoxicity. Archives of environmental contamination and toxicology, 75(3): 476-485. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0551-9>
- Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T. 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. Water Science and Technology, 25(11): 235-240, 1992.
<https://doi.org/10.2166/wst.1992.0297>
- Veselý, T., Tlustoš, P., Száková, J. 2012. Organic acid enhanced soil risk element (Cd, Pb and Zn) leaching and secondary bioconcentration in water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) in the rhizofiltration process. International journal of phytoremediation, 14(4): 335-349.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2011.620650>

- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardeni, B., Oliveira, L. F., Cabrera, L. C., Risso, W. E., Primel, E. G., Meletti, P. C., Fillmann, G., dos Reis Martinez, C. B. 2016. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542: 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>
- Vijayavel, K.; Gopalakrishnan, S.; Balasubramanian, M. P. 2007. Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, 69(6): 979-986. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.011>
- Wang, T., Knudsen, P. K., Brauner, C. J., Busk, M., Vijayan, M. M., Jensen, F. B. 1998. Copper exposure impairs intra-and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Physiology B*, 168(8): 591-599. <https://doi.org/10.1007/s003600050181>
- Wang, N., Jiang, M., Zhang, P., Shu, H., Li, Y., Guo, Z., Li, Y. 2020. Amelioration of Cd-induced bioaccumulation, oxidative stress and intestinal microbiota by *Bacillus cereus* in *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere*, 245: 125613. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125613>
- Weber, P., Behr, E. R., Knorr, C. D. L., Vendruscolo, D. S., Flores, E. M., Dressler, V. L., Baldisserotto, B. 2013. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species from different trophic levels in a subtropical Brazilian river. *Microchemical Journal*, 106: 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.004>
- Wood, C. M., Farrell, A. P., Brauner, C. J (Ed.) 2012. Homeostasis and toxicology of essential metals. Academic press.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L. Q. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the total Environment*, 368: 456-464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>
- Yu, C., Peng, X., Yan, H., Li, X., Zhou, Z., Yan, T. 2015. Phytoremediation ability of *Solanum nigrum* L. to Cd-contaminated soils with high levels of Cu, Zn, and Pb. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(5): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2424-4>